

Ivona Kuktić

**Praćenje antiagregacijske terapije metodom
optičke agregometrije na analitičkom sustavu
Sysmex CS-2500**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Suvremene biokemijske tehnike na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, a izrađen je u Kliničkom zavodu za kemiju KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Sandre Šuprahe Gorete i dr. sc. Sandre Margetić, znanstvene suradnice.

Hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Sandri Šuprahi Goreti na ukazanom povjerenju.

Veliko hvala dr. sc. Sandri Margetić na neizmjernoj pomoći, podršci i uloženom trudu prilikom pisanja ovog rada. Hvala Vam na svemu što ste me naučili.

Zahvaljujem se svojim roditeljima bez kojih ništa ne bi bilo moguće. Hvala na ogromnoj ljubavi, podršci i razumijevanju. Hvala što ste uvijek u svemu moj oslonac.

SADRŽAJ

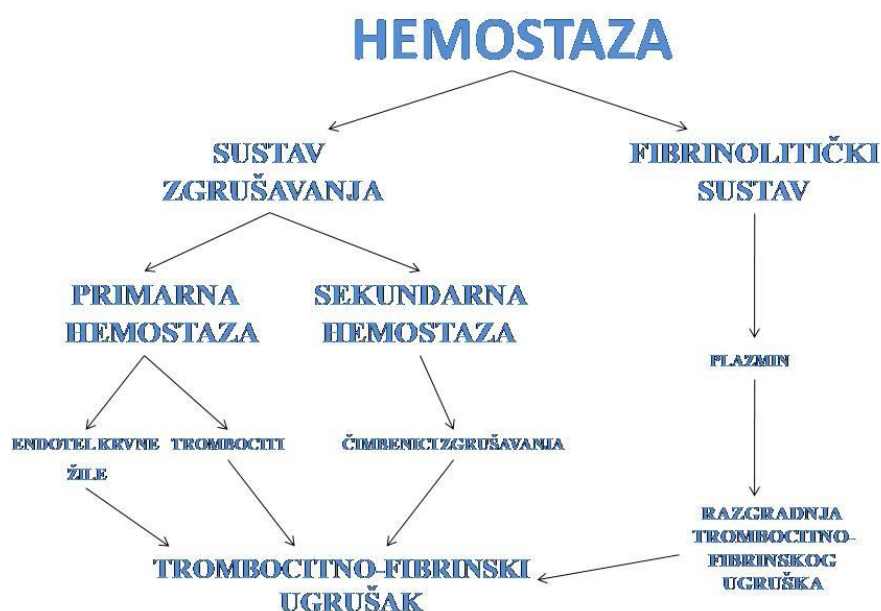
1.	UVOD.....	1
1.1.	Fiziološke osnove sustava hemostaze.....	1
1.1.1.	Primarna hemostaza.....	3
1.1.2.	Sekundarna hemostaza.....	5
1.1.3.	Fibrinolitički sustav.....	5
1.2.	Ispitivanje poremećaja hemostaze.....	6
1.2.1.	Agregometrija trombocita u dijagnostici trombocitopatija.....	6
1.3.	Metode mjerenja agregacije trombocita.....	7
1.3.1.	Optička agregometrija.....	7
1.3.2.	Impedancijska agregometrija.....	10
1.3.3.	Lumiagregometrija.....	11
1.3.4.	Novi sustavi mjerenja agregacije trombocita.....	11
1.4.	Antiagregacijska terapija.....	13
1.4.1.	Uloga trombocita u arterijskoj trombozi.....	13
1.4.2.	Prevenција i liječenje arterijske tromboze.....	14
1.4.3.	Vrste antiagregacijskih (antitrombocitnih) lijekova.....	15
1.4.3.1.	Inhibitori ciklooksigenaze-1 (COX-1).....	15
1.4.3.2.	Inhibitori ADP receptora.....	16
1.4.3.3.	Inhibitori fosfodiesteraze.....	17
1.4.3.4.	Antagonisti glikoproteinskog receptorskog kompleksa IIb/IIIa.....	18
1.4.3.5.	Mehanizmi neučinkovitog odgovora na antiagregacijske lijekove.....	18
1.5.	Agregometrija trombocita u praćenju antiagregacijske terapije.....	21
1.5.1.	Primjena agregometrije trombocita za procjenu oporavka funkcije trombocita nakon ukidanja antiagregacijske terapije.....	22
1.5.2.	Obilježja metoda agregometrije u praćenju antiagregacijske terapije.....	23
2.	OBRAZLOŽENJE TEME.....	25
3.	MATERIJALI I METODE.....	26
3.1.	Ispitanici.....	26
3.2.	Uzorci.....	26
3.3.	Metode.....	26

3.3.1.	Optička agregometrija na analitičkom sustavu Sysmex CS -2500.....	27
3.3.1.1.	Priprema uzoraka PRP-a i PPP-a.....	28
3.3.1.2.	Određivanje broja trombocita na hematološkom brojaču Sysmex XN 1000.....	29
3.3.1.3.	Priprema reagensa ADP i arahidonske kiseline (AA).....	29
3.3.1.4.	Postupak izvođenja optičke agregometrije trombocita na analizatoru Sysmex CS2500.....	31
3.3.1.4.1.	Postavljanje otopina za čišćenje, radnih otopina reagensa ADP i AA, fiziološke otopine (0,9% NaCl) i reakcijskih kiveta u analizator.....	31
3.3.1.4.2.	Postavljanje uzoraka PRP-a i PPP-a u analizator	33
3.3.1.4.3.	Očitavanje rezultata mjerenja.....	34
3.4.	Statistička obrada rezultata.....	35
4.	REZULTATI I RASPRAVA	36
4.1.	Deskriptivna statistika i statistička značajnost razlike ispitanih parametara u podskupinama bolesnika liječenih antiagregacijskim lijekovima.....	36
4.2.	Vrijednosti agregacije trombocita u bolesnika na antiagregacijskoj terapiji ASA ili inhibitorima ADP receptora kod kojih je navedena terapija ukinuta zbog operativnog zahvata.....	42
5.	ZAKLJUČAK	50
6.	LITERATURA	51
7.	SAŽETAK/SUMMARY	56
7.1.	Sažetak.....	56
7.2.	Summary.....	57
8.	PRILOZI	58
8.1.	POPIS KRATICA	58
9.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

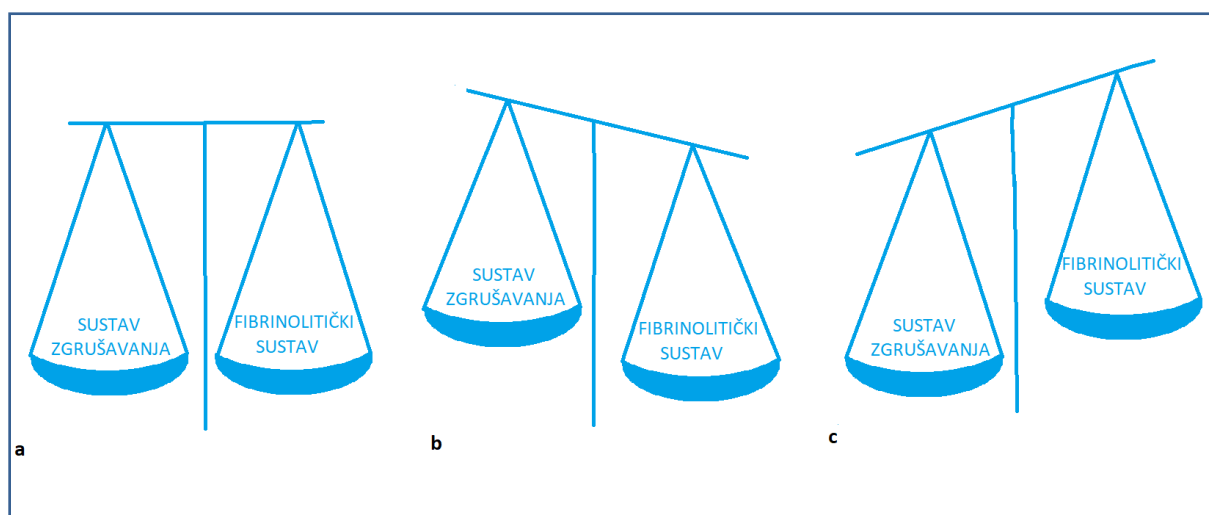
1.1. Fiziološke osnove sustava hemostaze

Hemostatski sustav je složen fiziološki proces zaustavljanja krvarenja na mjestu ozljede krvne žile te time ima važnu ulogu u zaštiti organizma od gubitka krvi. Ozljedom krvne žile aktivira se složena kaskada reakcija koje u konačnici imaju rezultat stvaranja krvnog ugruška i zaustavljanja krvarenja. Cjelokupni sustav hemostaze sastoji se od dvije osnovne sastavnice: sustava zgrušavanja (koji uključuje primarnu i sekundarnu hemostazu) i fibrinolitičkog sustava (Slika 1). U procesu primarne hemostaze ključnu ulogu imaju vaskularne endotelne stanice i trombociti pri čemu nastaje primarni ili trombocitni ugrušak na mjestu ozljede krvne žile (Bahuleyan, 2015). Sekundarna hemostaza uključuje aktivaciju pojedinih plazmatskih čimbenika zgrušavanja što dovodi do stvaranja fibrina i posljedičnog nastanka stabilnog trombocitno-fibrinskog ugruška. Istodobno s aktivacijom sustava zgrušavanja, aktivira se i fibrinolitički sustav koji ima za cilj ograničiti stvaranje nastalog ugruška na samo mjesto ozljede, a potom i razgraditi stvoreni ugrušak koji je ispunio svoju funkciju zaustavljanja krvarenja (Slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz pojedinih sastavnica sustava hemostaze: sustav zgrušavanja (uključuje proces primarne i sekundarne hemostaze) i fibrinolitički sustav

Pojedine sastavnice hemostatskog sustava, uključujući endotelne stanice krvnih žila, trombocite te brojne aktivatore i inhibitore zgrušavanja (prokoagulacijske i antikoagulacijske komponente zgrušavanja) kao i aktivatore i inhibitore sustava fibrinolize (profibrinolitičke i antifibrinolitičke komponente), međusobno su povezane te djeluju u strogo reguliranim složenim procesima u *in vivo* uvjetima (Bahuleyan, 2015). U normalnim fiziološkim uvjetima organizma sve su navedene sastavnice sustava zgrušavanja i fibrinolize u strogo reguliranoj dinamičkoj ravnoteži čime je spriječena i hipokoagulabilnost i hiperkoagulabilnost cirkulirajuće krvi. Narušavanje ove dinamičke ravnoteže zbog poremećaja u funkciji jedne ili više sastavnica sustava zgrušavanja i/ili fibrinolize rezultira poremećajem u cjelokupnom hemostatskom sustavu, koji se ovisno o uzroku i prirodi poremećaja očituje povećanom sklonošću krvarenja (smanjena aktivnost sustava zgrušavanja i/ili povećana aktivnost fibrinolitičkog sustava) ili trombozi (povećana aktivnost sustava zgrušavanja i/ili smanjena aktivnost fibrinolitičkog sustava), kako je prikazano na Slici 2 a, b i c.



Slika 2. Prikaz dinamičke ravnoteže sustava zgrušavanja i fibrinolitičkog sustava (a) i poremećaja sustava zgrušavanja i fibrinolize koji se očituju krvarenjem (b) ili trombozom (c)

1.1.1. Primarna hemostaza

Primarna hemostaza proces je nastanka primarnog trombocitnog ugruška na mjestu vaskularne ozljede u kojem sudjeluju endotel krvne žile i trombociti (McKenzie, 2014; Margetić, 2017).

Neposredno nakon ozljede krvne žile nastupa vazokonstrikcija ili kontrakcija krvne žile sa ciljem smanjenja gubitka krvi. Vaskularne endotelne stanice su poveznica između stijenke krvne žile i cirkulirajuće krvi te sintetiziraju mnogobrojne supstance koje su od ključne važnosti u procesu hemostaze (McKenzie, 2014). Ozljedom krvne žile dolazi do izlaganja kolagenskih vlakana subendotela cirkulirajućoj krvi što dovodi do adhezije trombocita na oštećeni endotel te njihove aktivacije i posljedične agregacije kako bi mogao nastati primarni ili trombocitni ugrušak u procesu primarne hemostaze (Margetić, 2018).

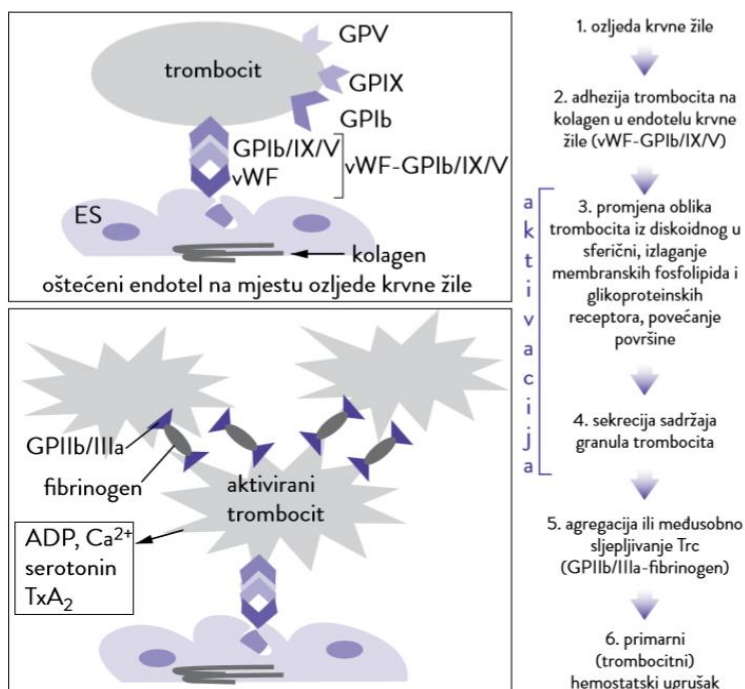
U procesu primarne hemostaze važnu ulogu imaju brojni trombocitni glikoproteinski receptori. Tako je za adheziju trombocita na kolagenska vlakna neophodan glikoproteinski kompleks Ib/IX/V (GP Ib/IX/V) koji se nalazi na površini trombocita i povezuje trombocit sa subendotelom. GP Ib/IX/V se preko von Willebrandovog čimbenika (vWF, *engl. von Willebrand factor*) veže na oštećeni endotel. VWF je veliki multimerni protein kojeg izlučuju endotelne stanice i megakariociti te se nalazi slobodan u cirkulirajućoj krvi i imobiliziran u subendotelnom matriksu. Veza između GP Ib/IX/V i vWF ostvaruje se preko glikoproteina Iba (GPIb α) i A1 domene vWF-a. (Gale, 2011).

Vežanje trombocita na kolagen rezultira aktivacijom trombocita, procesom koji je preduvjet za samu agregaciju ili međusobno sljepljivanje trombocita. Aktivacija trombocita obuhvaća niz morfoloških i funkcionalnih procesa uključujući promjenu oblika trombocita iz glatkoga diskoidnog u sferični oblik s izdancima, povećanje membranske površine trombocita, premještanje membranskih fosfolipida na vanjsku stranu trombocitne membrane i izlaganje membranskih glikoproteinskih receptora i sekrecije sadržaja granula. (Margetić, 2018.) Glikoproteini trombocitne membrane nalaze se na površini mirujućih ili neaktiviranih trombocita u inaktivnom obliku, a tek prilikom aktivacije trombocita dolazi do konformacijske promjene glikoproteinskih receptora čime se izlažu vezna mjesta za različite agonista agregacije poput fibrinogena, vWF-a, kolagena i fibronektina (Gale, 2011; Michelson, 2003).

Važnu ulogu u aktivaciji trombocita ima i trombin koji, pored brojnih drugih prokoagulantnih funkcija u procesu hemostaze, ujedno djeluje i kao snažan fiziološki aktivator trombocita čime ujedno povezuje primarnu i sekundarnu hemostazu. Trombin aktivira dva proteazom

aktivirana receptora (PAR, engl. *protease activated receptor*), PAR1 i PAR4, koji vezivanjem liganada imaju važnu ulogu u primarnoj hemostazi. (Gale, 2011).

Odgovor ostalih trombocita na aktivacijske promjene onih trombocita koji su se vezali na kolagen je od velike važnosti na daljnji tijek agregacije (Gale, 2011). Agregacija ili međusobno sljepljivanje susjednih trombocita odvija se pod utjecajem agonista agregacije adenozina-difosfata (ADP) i tromboksana A₂ (TXA₂) koji se oslobađaju iz aktiviranih trombocita te vezanjem fibrinogena na aktivacijom izloženi glikoproteinski kompleks IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) (Margetić, 2018). Rezultat ovih složenih procesa je stvaranje primarnog (trombocitnog) hemostatskog ugruška na mjestu ozljede krvne žile (Slika 3).



Slika 3. Funkcija trombocita u primarnoj hemostazi: adhezija, aktivacija i agregacija trombocita. Preuzeto iz: Margetić S, Čaržavec D. Bolesti hemostaze. U: Topić E. i sur., Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi, 2. Izdanje, Zagreb, Medicinska naklada, 2018. ES - endotelne stanice; GPIb/IX/V - glikoproteinski kompleks Ib/IX/V; GPIIb/IIIa - glikoproteinski kompleks; ADP - adenzin difosfat; Ca²⁺ - kalcijevi ioni; TxA₂ - tromboksan A₂

1.1.2. Sekundarna hemostaza

Sekundarna hemostaza je proces koji obuhvaća niz reakcija aktivacije pojedinih čimbenika zgrušavanja s ciljem stvaranja stabilnog trombocitno-fibrinskoga ugruška. Proces sekundarne hemostaze možemo podijeliti u tri faze: inicijacijska, amplifikacijska i propagacijska (Hoffman, 2001). Inicijacijska faza sekundarne hemostaze započinje izlaganjem tkivnog čimbenika (TF, *engl. tissue factor*) cirkulirajućoj krvi. TF se u fiziološkim uvjetima nalazi na unutarnjoj strani membrane stanica mnogih organa, a u cirkulaciju dopijeva tek nakon ozljede krvne žile kada se oslobađa iz liziranih stanica. TF se veže s FVII te zajedno tvore aktivni kompleks TF-FVIIa koji ubrzava aktivaciju čimbenika zgrušavanja FIX i FX. Aktivirani FXa se povezuje s FVa i tvori kompleks protrombinaze (FXa/FVa) koji potiče aktivaciju protrombina (FII) u trombin. Kako je već ranije navedeno, ovako nastali trombin snažan je fiziološki agonist agregacije trombocita. Nakon inicijacijske faze dolazi do amplifikacijske i propagacijske faze koje se odvijaju na samoj površini aktiviranih trombocita. Velike količine trombina stvorene aktivacijom sekundarne hemostaze dovode do pretvorbe fibrinogena u fibrin, odnosno do stvaranja stabilnog trombocitno-fibrinskog ugruška (Margetić, 2018).

1.1.3. Fibrinolitički sustav

Fibrinolitički sustav ima važnu ulogu u ograničavanju stvaranja ugruška samo na mjestu ozljede te u razgradnji fibrinskog ugruška koji je ispunio svoju zadaću (Margetić, 2018). U procesu fibrinolize ključna sastavnica je enzim plazmin koji nastaje aktivacijom plazminogena. Plazmin dovodi do razgradnje fibrina pri čemu nastaju razgradni produkti fibrinogena i fibrina različite veličine. Kao najmanji razgradni produkt nastaje D-dimer koji je specifičan pokazatelj razgradnje stvorenog fibrina plazminom. Fibrinolitički sustav je, jednako kao i sustav zgrušavanja, reguliran uravnoteženim djelovanjem fizioloških aktivatora i inhibitora (Dobrovolsky, 2002). Aktivatori fibrinolize su tkivni aktivatori plazminogena (tPA) i urokinazni aktivator plazminogena (uPA). U razgradnji fibrina glavnu ulogu ima tPA, dok uPA sudjeluje u aktivaciji plazminogena vezanog za stanice. Inhibitori fibrinolize su α_2 -antiplazmin (α_2 -AT) koji inhibira stvoreni plazmin, inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) koji inhibira tPA i uPA te trombinom aktivirani inhibitor fibrinolize (TAFI, *engl. thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*) koji inhibira pretvorbu plazminogena u plazmin.

1.2. Ispitivanje poremećaja primarne hemostaze

Poremećaji primarne hemostaze uključuju bolesti stijenke krvne žile i bolesti trombocita. Ovi se poremećaji klinički očituju krvarenjem primarno u kožu i sluznice, za razliku od poremećaja sekundarne hemostaze (nasljedni ili stečeni manjak čimbenika zgrušavanja) ili fibrinolize koje u pravilu obilježava krvarenje u duboke strukture tj. u mišiće, zglobove i unutarnje organe.

Bolesti stijenke krvne žile mogu biti nasljedne i stečene, a budući da laboratorijske pretrage ne pružaju dijagnostički podatak o ovim poremećajima, dijagnoza se postavlja uglavnom isključivanjem drugih uzroka krvarenja (Margetić, 2018). Bolesti trombocita uključuju kvantitativne poremećaje broja trombocita u perifernoj krvi: trombocitopenije (smanjeni broj trombocita) i trombocitoze (povećani broj trombocita) i kvalitativne poremećaje ili trombocitopatije koje obilježava poremećaj funkcije trombocita. I kvantitativni i kvalitativni poremećaji trombocita mogu biti nasljedni i stečeni. U dijagnostici poremećaja primarne hemostaze kao osnovne i početne dijagnostičke pretrage kao što su broj trombocita, srednji volumen trombocita (MPV, engl. *mean platelet volume*), pokazatelji dobiveni na hematološkim analizatorima u sklopu kompletne krvne slike. Dijagnostika bolesti trombocita potom se proširuje specifičnim dijagnostičkim pretragama - agregometrijom trombocita, koja predstavlja ključnu i nezaobilaznu metodu ispitivanja, posebice u dijagnostici nasljednih trombocitopatija (Dovlatova 2015). Posljednjih godina različite metodologije mjerenja agregabilnosti trombocita imaju sve veću primjenu i u drugim kliničkim stanjima koje obilježava poremećaj funkcije trombocita, kao što su stečene trombocitopatije i praćenje antiagregacijske terapije, što je predmet i cilj ovog diplomskog rada.

1.2.1. Agregometrija trombocita u dijagnostici trombocitopatija

Ispitivanje funkcije trombocita mjerenjem njihove agregabilnosti već se desetljećima koriste u sklopu laboratorijske dijagnostike kod bolesnika s krvarenjem s ciljem utvrđivanja uzroka krvarenja te u praćenju učinka prohemostatske terapije u bolesnika s visokim rizikom za krvarenje (Dovlatova, 2015; Margetić, 2017). Kod bolesnika sa sumnjom na nasljedne trombocitopatije (nasljedni poremećaji funkcije trombocita) ove pretrage dio su osnovnog dijagnostičkog panela pretraga (Hayward, 2008; Harrison, 2011). Agregometrija trombocita uz primjenu različitih agonista agregacije (adenozin difosfata (ADP), kolagena, epinefrina, arahidonske kiseline (AA) i ristocetina) omogućuje diferencijalnu dijagnostiku pojedinih nasljednih trombocitopatija, kao što su Bernard-Soulierov sindrom (manjak GPIb/IX), von

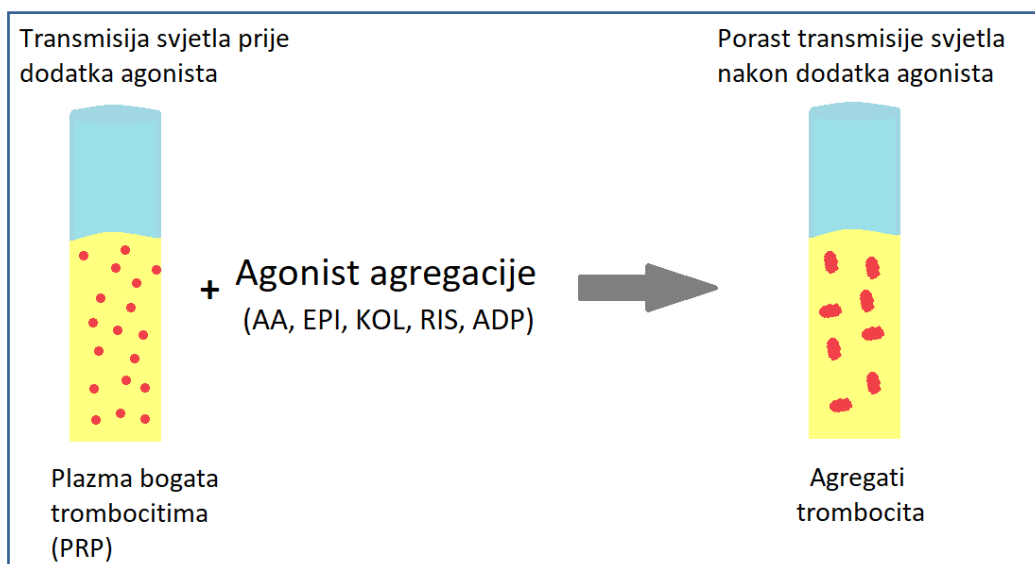
Willebrandovu bolest (kvantitativni ili kvalitativni manjak vWF), trombasteniju Glanzmann (manjak GPIIb/IIIa) i druge (poremećaji receptora za ADP, kolagen ili epinefrin te poremećaji trombocitnih granula) (Harrison, 2011; Margetić, 2017). U dijagnostici stečenih trombocitopatija uzrokovanih patofiziološkim stanjima (brojni lijekovi koji utječu na funkciju trombocita, maligne hematološke bolesti, uremija, bolesti jetre) pretrage agregacije trombocita se znatno rjeđe koriste uglavnom zbog male dijagnostičke i prediktivne značajnosti. Posljednjih godina, agregometrija trombocita ima sve veću kliničku primjenu u bolesnika na antiagregacijskoj ili antitrombocitnoj terapiji, o čemu će biti govora u daljnjem tekstu ovog rada.

1.3. Metode mjerenja agregacije trombocita

Ispitivanje funkcije trombocita mjerenjem njihove agregabilnosti, se prema metodologiji može podijeliti u četiri grupe: 1. optička agregometrija, 2. impedancijska agregometrija, 3. lumiagregometrija i 4. novi sustavi za mjerenje agregacije trombocita u punoj krvi (Margetić, 2017; Pannicia, 2015).

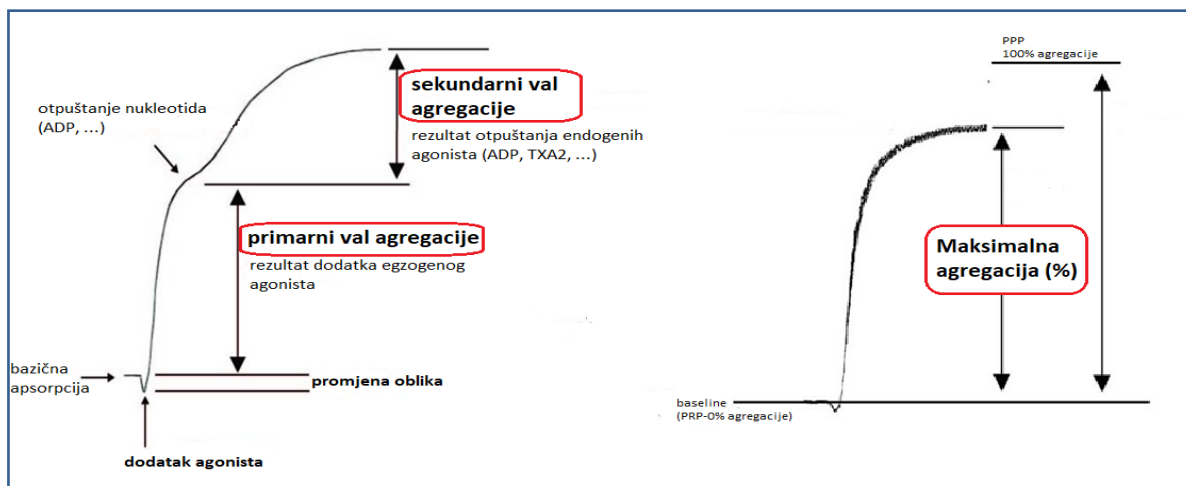
1.3.1. Optička agregometrija

Optička agregometrija utemeljena je davne 1960. godine te još uvijek predstavlja "zlatni standard" u ispitivanju funkcije trombocita, u prvom redu nasljednih trombocitopatija. Načelo optičke agregometrije trombocita je mjerenje prijenosa (transmisije) svjetlosti u uzorku plazme bogate trombocitima (PRP, engl. *platelet rich plasma*) kojoj se kao reagensi dodaju različiti agonisti agregacije trombocita: ADP, epinefrin, kolagen, AA i ristocetin. Dodatkom pojedinih agonista dolazi do nastanka trombocitnih agregata i porasta transmisije svjetlosti u odnosu na transmisiju svjetlosti u uzorku PRP-a prije dodatka agonista (Slika 4).



Slika 4. Načelo optičke agregometrije trombocita. PRP - plazma bogata trombocitima (engl. *platelet rich plasma*); AA - arahidonska kiselina (engl. *arachidonic acid*); EPI - epinefrin; KOL - kolagen; RIS - ristocetin; ADP - adenzin difosfat

U određenom vremenskom intervalu mjerenja (5-10 minuta) određuje se brzina i maksimalni postotak porasta transmisije svjetlosti te se nastali signal prevodi u grafičku krivulju kontinuiranog praćenja porasta transmisije svjetlosti. Dobivena grafička krivulja omogućuje razlikovanje primarnog odgovora trombocita na dodatak egzogenog agonista i sekundarnog odgovora na otpuštanje endogenih agonista iz trombocitnih granula (Slika 5). Rezultat se brojčano izražava kao postotak agregacije trombocita koji predstavlja maksimalnu agregabilnost trombocita.



Slika 5. Grafički prikaz krivulje agregacije mjerene optičkom metodom

Iako optička agregometrija do danas predstavlja najsveobuhvatniju metodu u dijagnostici različitih poremećaja funkcije trombocita, njezinu kliničku primjenu otežavaju brojni čimbenici uključujući one predanalitičke (aktivacija trombocita *in vitro*, priprema analitičkog uzorka PRP-a), analitičke (primjena različitih agonista i različitih koncentracija pojedinih agonista, te nepostojanje adekvatnog uzorka za unutarnju analitičku kontrolu) i postanalitičke (različite referentne vrijednosti i nepostojanje jasno definiranih graničnih vrijednosti i terapijskih intervala što značajno otežava interpretaciju rezultata (Margetić, 2017). Stoga je tijekom godina primjene optičke agregometrije trombocita postala jasna potreba za definiranjem barem minimalnih standardizacijskih kriterija koji bi omogućili usporedivost rezultata među različitim laboratorijima. Rezultat ovih nastojanja bio je da je Međunarodno društvo za hemostazu i trombozu (ISTH, engl. *International Society on Thrombosis and Haemostasis*) 2013. godine objavilo preporuke za standardizaciju svih faza analitičkog procesa u primjeni optičke agregometrije u dijagnostici trombocitopatija (Cattaneo, 2013; Margetić, 2017) (Tablica 1).

Tablica 1. Standardizacija optičke agregometrije trombocita. Preuzeto iz: Margetić S. Agregacija trombocita. Kako, kada i zašto mjeriti. U: Getaldić i sur. Trombociti - interdisciplinarni pristup, Zagreb, Medicinska naklada, 2017; str: 49-68.

Čimbenik	Standardizirani postupak	Napomena
Priprema bolesnika	Anamneza uzetih lijekova 10 dana prije pretrage Prestanak uzimanja lijekova koji inhibiraju funkciju trombocita* (npr. ukinuti nesteroidne antiupalne lijekove 3 dana prije uzorkovanja)	Ukoliko liječenje lijekovima koji utječu, na funkciju trombocita ne smije biti ukinuto prije uzorkovanja, utjecaj ovih lijekova treba uzeti u obzir pri interpretaciji rezultata pretraga * Izuzetak od ovog pravila su bolesnici na antiagregacijskoj terapiji
Uzorkovanje	Spriječiti aktivaciju trombocita <i>in vitro</i> Antikoagulans 3,2% (109 mM) ili 3,8% (129 mM) natrijev-citrat Održati stabilan pH 7,2-8 u uzorku - preporuka je koristiti spremnike užeg promjera i držati ih zatvorene	Minimalna venska staza (podveza < 1 minute) Spremnik: plastični (polipropilenski) ili stakleni silikonizirani Ne koristiti obe koncentracije citrata - razlike u rezultatima mogu biti značajne kod nižih koncentracija agonista Prva 3-4 mL uzorkovane krvi odbaciti ili koristiti za druge koagulacijske pretrage (PV, APTV) Kod pH < 6,4 potpuno izostaje agregabilnost trombocita, a kod pH > 8,0 prisutna je spontana agregacija trombocita. Promjena pH u plazmi je posredovana difuzijom CO ₂ iz plazme
Dozvoljeno vrijeme analize	Uzorak Unutar 4 sata od uzorkovanja se ne može pohraniti za analizu	Uzorak je potrebno dostaviti u laboratorij unutar 1 sata od uzorkovanja na sobnoj temperaturi u zatvorenom spremniku. Pothlađivanje uzorka uzrokuje aktivaciju trombocita te spontanu agregaciju nakon zagrijavanja ili miješanja
Centrifugiranje	PRP: 200-250 g 10 minuta PPP: 1500g 15 minuta Uzorak pune krvi držati na sobnoj temperaturi 15 minuta prije centrifugiranja, a uzorke PRP-a i PPP-a 15 minuta nakon centrifugiranja	U uzorcima s vrlo visokim brojem trombocita potrebno je uzorak krvi ostaviti da se sedimentira prije centrifugiranja Uzorak PPP-a dobiva se centrifugiranjem pune krvi ili krvi iz koje je prethodno uklonjen dobiveni uzorak PRP-a Analiza odmah nakon pripreme PRP-a može rezultirati smanjenim agregacijskim odgovorom
Hemoliza Lipemija	Hemoliza – neadekvatan uzorak; ponoviti uzorkovanje Lipemija – neadekvatan uzorak	Hemoliza rezultira otpuštanjem ADP-a iz eritrocita što trombocite čini neosjetljivima na dodatak egzogenog ADP-a Lipemija interferira u optičkom mjerenju. Ukoliko se agregacija izvodi u lipemičnom uzorku potrebno je rezultat izdati uz napomenu o nepouzdanosti rezultata
Kontrolni postupak	Uzorak dobiven od zdrave osobe	Budući da nije dostupan komercijalni kontrolni uzorak, potrebno je koristiti uzorak zdrave osobe kao kontrolni materijal paralelno s ispitivanjem u uzorku ispitanika
Broj trombocita u PRP-u	Trc ≤ 600x10 ⁹ /L – broj trombocita se ne podešava Trc > 600x10 ⁹ /L – uzorak PRP-a se razrijeđuje fiziološkom otopinom (nije preporučeno koristiti autološki PPP uzorak za razrjeđivanje) Trc < 150x10 ⁹ /L	Agregacija se izvodi bez podešavanja broja trombocita na standardiziranu vrijednost s uzorkom autološkog PPP-a do vrijednosti trombocita 600x10 ⁹ /L (podešavanje utječe na agregabilnost trombocita) Ako se analiza izvodi u uzorku s brojem trombocita < 150x10 ⁹ /L u svrhu isključivanja težih oblika poremećaja funkcije trombocita, potreban je oprez pri interpretaciji rezultata, te se preporuča nalaz izdati uz napomenu o nepouzdanosti rezultata.
Agonisti i preporučene koncentracije agonista	ADP 2 μM Epinefrin 5 μM Kolagen 2 μg/mL Arahidonska kiselina 1 μM Ristocetin 1,2 μg/mL	Navedene preporučene koncentracije ADP-a (2 μM) i epinefrina (5 μM) proizvode bifazičnu krivulju agregacije (primarni i sekundarni val), dok je kod visokih koncentracija bifazični odgovor maskiran Veće koncentracije pojedinih agonista mogu se koristiti za dodatno ispitivanje ako izostaje agregabilnost uz navedene preporučene koncentracije.

1.3.2. Impedancijska agregometrija

Impedancijska agregometrija je metoda kojom se mjeri porast električnog otpora (impedancije) između elektroda postavljenih na putu prolaza uzorka pune krvi (Paniccia, 2015). Porast električnog otpora nastaje kao posljedica agregacije aktiviranih trombocita nakon dodatka odgovarajućih agonista. Mjerenje se izvodi u punoj krvi što bolje odražava *in vivo* uvjete jer i ostale stanice poput eritrocita i leukocita svojim prokoagulantnim sastojcima doprinose agregabilnosti trombocita. Korištenje pune krvi kao uzorka ima prednost i u tome što je potreban manji volumen uzorka te se izbjegava predanalitička priprema uzorka, a samim time i predanalitičke pogreške. S druge strane, unatoč ovim navedenim prednostima, impedancijska agregometrija nije zamijenila optičku agregometriju i još je uvijek značajno manje zastupljena metoda mjerenja agregacije trombocita u kliničkoj praksi. Razlozi tome su nemogućnost razlikovanja primarnog i sekundarnog vala agregacije, metoda ne korelira sa

sekrecijom trombocita te ova metoda ne pruža dodatnu dijagnostičku informaciju u odnosu na optičku agregometriju (Margetić, 2017).

1.3.3. Lumiagregometrija








Ispitivanje agregacije trombocita lumiagregometrijom temelji se na mjerenju agregabilnosti trombocita optičkom ili impedancijskom metodom uz istodobnu dodatnu primjenu bioluminiscencije kojom se mjeri oslobađanje nukleotida iz trombocita tijekom sekundarnog vala agregacije (Paniccia, 2015). ADP oslobođen iz gustih granula trombocita prevodi se u adenozin trifosfat (ATP) koji reagira s luciferin-luciferaza sustavom tvoreći adenin-luciferon. Intenzitet emitiranog svjetla razmjernan je količini nastalog ATP-a. Ovom metodom se uz ispitivanje agregabilnosti trombocita dobiva podatak i o sekreciji iz trombocitnih granula što omogućava otkrivanje poremećaja broja i sadržaja granula trombocita, poremećaje sekrecije ili degranulacije trombocita. Međutim, ova je metoda rijetko zastupljena u kliničkoj praksi, primarno stoga jer je dostupna samo na nekim (rijetkim) optičkim ili impedancijskim agregometrima (Fritsma, 2007; Margetić, 2017).

1.3.4. Novi sustavi mjerenja agregacije trombocita

Iako se tradicionalne metode ispitivanja funkcije trombocita, kao što je optička agregometrija, i danas smatraju „zlatnim standardom“ u dijagnostici trombocitopatija, istodobno imaju i neka ograničenja koja onemogućuju njezinu primjenu izvan specijaliziranih koagulacijskih laboratorija. Naime, klasična optička agregometrija trombocita je tehnički i vremenski zahtjevna metoda, potreban je veliki volumen uzorkovane venske krvi te se uzorci ne mogu pohraniti za analizu. S druge strane, usporedo sa izrazitim i trajnim porastom broja bolesnika na antiagregacijskoj terapiji, posljednjih se godina klinička primjena agregometrije trombocita nametnula i u svrhu praćenja antiagregacijske terapije, procjene rizika krvarenja u liječenih bolesnika, kao i procjene oporavka funkcije trombocita u bolesnika u kojih je ukinuta antiagregacijska terapija prije operativnog zahvata (Gachet, 2008; Lenk, 2014; Orme 2017). Ovo je rezultiralo tehnološkim razvojem novih sustava za ispitivanje funkcije trombocita, na malim i prenosivim analitičkim uređajima u uzorku pune krvi (Harrison, 2005). Ovi su uređaji znatno jednostavniji i brži za izvedbu u odnosu na „klasičnu“ optičku agregometriju. Primjenjivi su uglavnom u svrhu probira ispitivanja funkcije trombocita te kao pretrage za praćenje antiagregacijske terapije, a zbog ranije navedenih karakteristika (veličina, brzina i

jednostavnost) omogućili su primjenu agregometrije trombocita i izvan specijaliziranih koagulacijskih laboratorija te kao pretrage uz bolesnika (POCT, engl. *point of care testing*) u različitim kliničkim specijalnostima, u prvom redu u kardiološkim, kirurškim i drugim intenzivnim jedinicama liječenja. Osnovne prednosti ovih novih jednostavnijih analizatora za mjerenje agregabilnosti trombocita su brzina analize, jednostavnost izvedbe, korištenje pune krvi kao uzorka, manja količina uzorkovane krvi i nepotrebna priprema uzorka (Panniccia, 2015; Harrison, 2005). S druge strane, potrebno je imati na umu da ovi sustavi imaju ograničenu dijagnostičku vrijednost u odnosu na klasične agregometrijske metode te da, patološki nalaz kojim se postavlja sumnja na, primjerice, nasljednu trombocitopatiju, zahtijeva primjenu klasične optičke ili impedancijske agregometrije.

Noviji testni sustavi mjerenja agregacije trombocita se prema svojoj metodologiji mogu podijeliti na one čije se mjerenje temelji na 1. adheziji trombocita (PFA100, IMPACT:Cone and Plate(Let) analyzer), 2. na modifikaciji metoda klasične optičke ili impedancijske agregometrije trombocita (VerifyNow, PlatelteWorks, Multiplate, ROTEM) te 3. na mjerenju viskozielastometrije (TEG Platelet Mapping System) (Slika 6). Posljednjih godina ovi noviji i jednostavniji analitički sustavi mjerenja agregacije trombocita postupno pronalaze sve veću kliničku primjenu u praćenju antiagregacijske terapije što je ujedno bio i glavni razlog njihova nastanka.

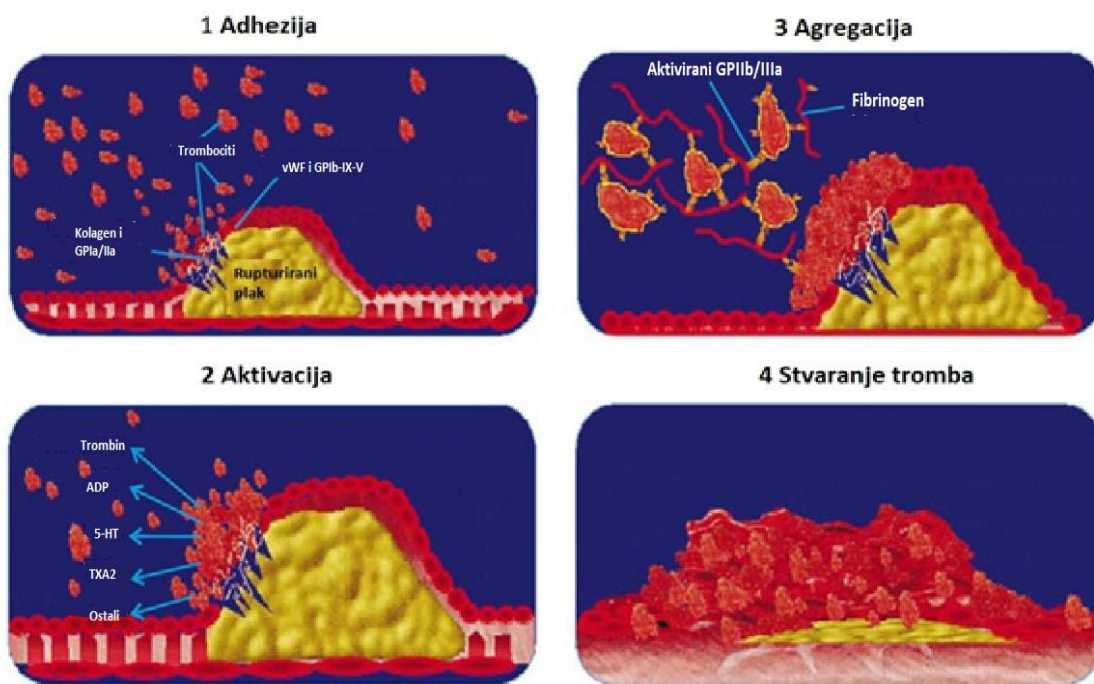
Podjela metoda prema načelu mjerenja	Sustav
Adhezija trombocita simulira proces primarne hemostaze <i>in vivo</i>	<div> <div>PFA-100  Siemens, Njemačka</div> <div>IMPACT  DiaMed, Švicarska</div> </div>
Impedancija mjeri promjenu el. otpora	<div> <div> Roche, Švicarska Multiplate</div> <div>ROTEM Pletelet module </div> <div> Helenalab, SAD PlateletWorks/Ichor</div> </div>
Optička metoda mjeri promjenu transmisije svjetla	<div> <div>VerifyNow  Accumetrix, SAD</div> </div>
Viskozielastometrija (TEG) uz dodatak modula za agregaciju	<div> <div>TEG Platelet Mapping System  Haemoscope, SAD</div> </div>

Slika 6. Podjela novih sustava za mjerenje agregacije trombocita prema metodologiji

1.4. Antiagregacijska terapija

1.4.1. Uloga trombocita u arterijskoj trombozi

Osim u stvaranju normalnog hemostatskog ugruška nakon ozljede krvne žile, trombociti imaju ključnu ulogu i u patogenezi arterijske tromboze (Gawaz 2005, Margetić, 2012). U patofiziološkoj podlozi arterijske tromboze je ateroskleroza ili kronična upalna bolest stijenke krvne žile. Izravna posljedica uznapredovale ateroskleroze je arterijska tromboza koja se klinički očituje akutnim ishemijskim događajima, akutnim infarktom miokarda (AIM) ili moždanim udarom (MU). Progresijom ateroskleroze dolazi do rupture aterosklerotskog plaka i izlaganja trombogenog materijala u subendotel što za posljedicu ima adheziju i aktivaciju trombocita te njihovu agregaciju u slijedu događaja istovjetnim onima kod ozljede krvne žile, ali u ovom slučaju dolazi do nastanka patološkog tromba koji blokira protok krvi i uzrokuje akutni ishemijski događaj (Margetić, 2018). Funkcija trombocita u patogenezi arterijske tromboze prikazana je na Slici 7.



Slika 7. Uloga trombocita u patogenezi arterijske tromboze nakon rupture aterosklerotskog plaka. Ruptura aterosklerotskog plaka rezultira adhezijom (1), aktivacijom (2) i agregacijom (3) trombocita, ali za razliku od fiziološke hemostaze, rezultat je stvaranje patološkog ugruška ili tromba (4). vWF-von Willebrandov faktor (engl. *von Willebrand factor*); GPIa/IIa - glikoproteinski kompleks Ia/IIa; GPIb-IX-V - glikoproteinski kompleks Ib-IX-V; GPIIb/IIIa - glikoproteinski kompleks IIb/IIIa; ADP - adenozin difosfat; 5-HT-5 - hidroksitriptamin, serotonin; TXA2 - tromboksan A2

Dosadašnje studije na bolesnicima s akutnim koronarnim sindromom potvrdile su da glavninu koronarnog tromba čine upravo trombociti te da su kod takvih bolesnika povišene vrijednosti cirkulirajućih medijatora koje luče trombociti poput tromboksana A2. Ranije je prevladavalo mišljenje da trombociti sudjeluju samo u završnim stadijima ateroskleroze, no novija istraživanja govore u prilog tome da trombociti sudjeluju i u procesima ranih stadija ateroskleroze (Vrsalović, 2009).

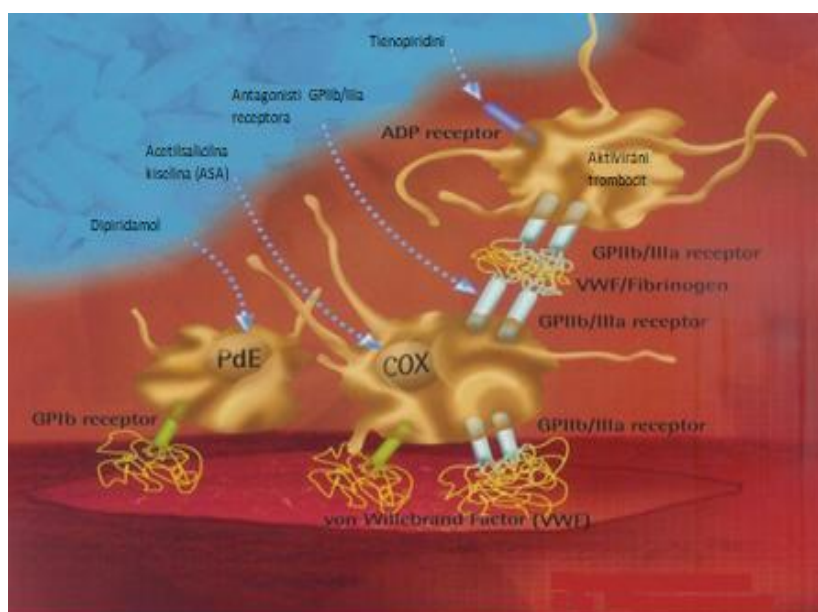
1.4.2. Prevencija i liječenje arterijske tromboze

S obzirom na važnu i nezaobilaznu ulogu trombocita u nastanku patološkog tromba u arterijskim krvnim žilama, jedna od široko primjenjivih terapijskih mogućnosti u prevenciji i liječenju arterijske tromboze jest upravo primjena antiagregacijskih ili antitrombocitnih

lijekova koji inhibiraju funkciju trombocita. Primjena antiagregacijskih lijekova u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih incidenata, te tijekom koronarnih intervencija danas predstavlja neizostavni dio terapijskog pristupa u ovim bolestima (Margetić, 2017; Bergovec 2010).

1.4.3. Vrste antiagregacijskih (antitrombocitnih) lijekova

Nekoliko je skupina antiagregacijskih lijekova, od kojih svaka selektivno inhibira određeni put trombocitne aktivacije. Pojedine skupine antiagregacijskih lijekova i njihov molekularni cilj djelovanja prikazani su na Slici 8.



Slika 8. Skupine antiagregacijskih lijekova i njihov molekularni cilj djelovanja na inhibiciju funkcije trombocita. Preuzeto iz: Dade Behring, Holding GmbH, 131556 E 03/05. GPIIb/IIIa - glikoproteinski kompleks IIb/IIIa; ASA - acetilsalicilna kiselina (engl. *acetylsalicylic acid*); PdE - fosfodiesteraza; vWF - von Willebrandov faktor; COX - ciklooksigenaza

1.4.3.1. Inhibitori ciklooksigenaze-1 (COX-1)

Najstariji, najpoznatiji te još i danas najčešće primjenjivan antiagregacijski lijek je acetilsalicilna kiselina (ASA, engl. *acetylsalicylic acid*). Lijekovi iz ove skupine su *Aspirin*[®], *Andol*[®], *Kardiopirin*[®], a svoj farmakološki učinak ostvaruju inhibicijom aktivnosti enzima ciklooksigenaze-1 (COX-1) u trombocitima, acetilacijom serinskog ostatka na poziciji 529,

čime je inhibirana sinteza TXA₂ iz arahidonske kiseline (AA, engl. *arachidonic acid*). TXA₂ djeluje kao snažan fiziološki agonist agregacije trombocita i vazokonstriktor, te je inhibicijom njegove sinteze suprimiran važan put aktivacije trombocita i njihove posljedične agregacije. S obzirom da trombociti nemaju jezgru, ne mogu sintetizirati novi COX-1 enzim nakon inhibicije primjenom ASA-e. Stoga je inhibicija COX-1 enzima djelotvorna tijekom čitavog života trombocita u cirkulaciji, odnosno prosječno oko 9 dana. Doza kojom se postiže antiagregacijski učinak na trombocite iznosi od 75 do 100 mg dnevno (Bergovec, 2010). Inhibitorski učinak ASA-e na funkciju trombocita postiže se već jedan sat nakon uzimanja lijeka, a maksimalna koncentracija u cirkulaciji postiže se nakon 30-40 minuta. Poluvrijeme života ASA-e u cirkulaciji je 15 minuta. Primjenom većih doza, ASA uz antiagregacijski učinak ima i analgetsko, antipiretsko i protuupalno djelovanje. Za razliku od malih doza ASA-e koje imaju antiagregacijski učinak, visoke doze ovog lijeka imaju jače izražene analgetske i protuupalne učinke. Najčešći neželjeni učinak kontinuirane primjene malih doza ASA-e je povećani rizik krvarenja, prvenstveno gastrointestinalnog, koje predstavlja najčešći neželjeni učinak liječenja ASA-om kao antiagregacijskim lijekom (Bergovec, 2010).

1.4.3.2. Inhibitori ADP receptora

Inhibitori ADP receptora uključuju lijekove iz skupine tienopiridina: tiklopidin i klopido­grel (*Plavix*[®], *Pigrel*[®], *Zilt*[®]) te noviji lijek prasugrel (*Efient*[®]). Novija generacija lijekova koji djeluju kao inhibitori ADP receptora su tikagrelor (*Brilique*[®]) i kangrelor (*Kengrexal*[®]) koji ne spadaju u lijekove iz skupine tienopiridina (Bergovec, 2010).

Trombocitni ADP receptori imaju važnu ulogu u procesu primarne hemostaze jer vežu ADP koji djeluje kao snažan agonist agregacije trombocita. Na trombocitnoj membrani se nalaze dva ADP receptora: P2Y₁ i P2Y₁₂. P2Y₁ sudjeluje u početnoj fazi agregacije trombocita, pa vezanjem ADP-a na P2Y₁ receptor dolazi do slabe i prolazne trombocitne agregacije. Tek vezanjem na P2Y₁₂ receptor, ADP dovodi do trajne i snažne aktivacije i posljedične agregacije trombocita preko inhibicije fosforilacije vazodilatator stimulirajućeg fosfoproteina (VASP). P2Y₁₂ receptor ujedno je i molekularni cilj djelovanja lijekova iz skupine inhibitora ADP receptora.

Najstariji lijek iz skupine inhibitora ADP receptora je tiklopidin, lijek koji danas više nije u uporabi i zamijenjen je klopido­grelom uglavnom zbog učestalih neželjenih učinaka, u prvom redu neutropenije i agranulocitoze i poremećaja jetrene funkcije (Bergovec, 2010; Knežević, 2014).

Tienopiridinski inhibitori ADP receptora su prolijekovi koji se tek metaboličkom pretvorbom u jetri djelovanjem enzimskog sustava citokrom P450 (CYP3A4 i CYP3A5) prevode u aktivne metabolite koji potom ostvaruju farmakološki učinak ireverzibilnom inaktivacijom P2Y₁₂ receptora.

Prasugrel je noviji tienopiridinski lijek treće generacije koji djeluje na isti način kao i klopido­grel tj. ireverzibilno inhibira P2Y₁₂ receptor.

Najnoviju generaciju inhibitora ADP receptora čine lijekovi koji nisu tienopiridini, tikagrelor i kangrelor. Ovi lijekovi su, za razliku od tienopiridina reverzibilni inhibitori P2Y₁₂ receptora. Općenito, dosadašnja istraživanja pokazala su da noviji lijekovi iz skupine ADP receptora, kao što su prasugrel i tikagrelor, imaju jači antiagregacijski učinak te brži početak i dulje djelovanje u odnosu na klopido­grel (Bergovec, 2010; Knežević, 2014).

Navedene dvije skupine lijekova, inhibitori COX-1 enzima i inhibitori ADP receptora najčešće su primjenjivani antiagregacijski lijekovi. Ovisno o težini kliničkog stanja i čimbenicima rizika, primjenjuju se zasebno ili u kombinaciji (tzv. dvojna ili kombinirana antiagregacijska terapija). Istodobna primjena navedene dvije skupine antiagregacijskih lijekova učinkovitija je od pojedinačne terapije zbog različitih mehanizama djelovanja na inhibiciju agregacije trombocita čime se postiže jači antiagregacijski učinak (Bhatt, 2006). Stoga se dvojna ili kombinirana terapija primjenjuje u skupini najugroženijih kardioloških i neuroloških bolesnika koji imaju više čimbenika rizika ili su već preboljeli arterijsku trombozu te je procijenjeno da imaju visok rizik za ponavljajući trombotički događaj.

1.4.3.3. Inhibitori fosfodiesteraze

Lijekovi koji djeluju kao inhibitori fosfodiesteraze značajno se manje primjenjuju u prevenciji i liječenju arterijske tromboze. Ovi lijekovi inhibiraju aktivnost enzima fosfodiesteraze (Pde) u trombocitima, koji katalizira razgradnju cikličkog adeno­zin monofosfata (cAMP) u adeno­zin monofosfat (AMP), čime se regulira raspoloživost cikličkih nukleotida AMP-a u stanicima. Budući da cAMP djeluje kao fiziološki inhibitor agregacije trombocita, primjena lijeka dovodi do nakupljanja cAMP-a i posljedične pojačane inhibicije agregacije trombocita (Gresele, 2011). Lijek iz ove skupine je dipiridamol (*Persantin*), koji se danas vrlo rijetko koristi kao zaseban lijek, osim sporadično kao kombinirani lijek s acetilsalicilnom kiselinom (lijek *Aggrastat*[®]). Za lijekove iz skupine inhibitora fosfodiesteraze nije dostupan specifičan

agonist koji bi omogućio specifično određivanje stupnja inhibicije agregabilnosti trombocita potaknuto djelovanjem ovog lijeka.

1.4.3.4. Antagonisti glikoproteinskog receptorskog kompleksa IIb/IIIa

Antagonisti glikoproteinskog receptorskog kompleksa IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) predstavljaju najsnažnije inhibitore agregacije trombocita koji uzrokuju vrlo brzu i potpunu inhibiciju agregabilnosti trombocita uz sve fiziološke agoniste agregacije (ADP, epinefrin, kolagen), zbog čega se ova skupina lijekova može koristiti isključivo tijekom invazivnih kardioloških postupaka liječenja AIM uz intravensku primjenu, ali ne i u dugotrajnoj prevenciji i liječenju kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih incidenata (Stangl, 2010). Učinak inhibicije na agregabilnost trombocita počinje već 5 minuta nakon intravenske primjene, a traje do 14 sati, nakon čega se funkcija trombocita postupno potpuno normalizira. U ovu skupinu spadaju lijekovi abciximab (*ReoPro*[®]), eptifibatide (*Integrilin*[®]) i tirofiban (*Aggrastat*[®]) (Stangl, 2010).

1.4.3.5. Mehanizmi neučinkovitog odgovora na antiagregacijske lijekove

Sa sve većom primjenom antiagregacijske terapije, uočene su značajne razlike u djelotvornosti antiagregacijskih lijekova kod pojedinih bolesnika. Ovo je potaknulo brojne rasprave u literaturi o postojanju tzv. rezistencije na antiagregacijske lijekove (Michelson, 2006; Cattaneo, 2007; Verstuyft 2009). Općenito, rezistencija na neki lijek označava nesposobnost lijeka da djeluje na određeni farmakološki cilj. Kada se ova definicija primjeni na antiagregacijske lijekove, rezistencija na aspirin označava nesposobnost lijeka da putem COX-1 enzima inhibira sintezu TXA₂, a rezistencija na inhibitore ADP receptora označava nesposobnost ovih lijekova da inhibiraju P2Y₁₂ receptor. Međutim, na temelju dosadašnjih istraživanja koja su proučavala fenomen rezistencije na antiagregacijske lijekove, pokazano je da postoji čitav niz potencijalnih uzroka i mehanizama koji mogu dovesti do rezistencije (Michelson, 2006; Kulickowski, 2009). Nadalje, budući da su ateroskleroza i posljedična arterijska tromboza bolesti na čiji nastanak, tijek i progresiju utječe čitav niz patofizioloških čimbenika (multičimbenična priroda bolesti), smatra se da je nemogućnost djelovanja ovih lijekova samo jedan od uzroka koji uzrokuje rezistenciju na antiagregacijske lijekove, te da je stoga ispravnije govoriti o neučinkovitom odgovoru na liječenje (engl. *treatment failure*), a ne o rezistenciji na lijek. S kliničkog aspekta neučinkovit odgovor na liječenje označava razvoj

neželjenih događaja, odnosno pogoršanju bolesti ili nastanak trombotičkog događaja unatoč liječenju (Michelson, 2006; Nguyen 2005). S laboratorijskog aspekta, neučinkovit odgovor na liječenje označava izostanak odgovarajućeg stupnja smanjenja agregabilnosti trombocita mjerene metodama agregacije trombocita. U literaturi se navode vrlo različiti podaci o pojavnosti neučinkovitog odgovora na lijek, što značajno ovisi i o metodi koja se koristi (Siedel, 2011). Pokazano je da se primjenom metoda koje koriste specifičan agonist za određenu skupinu lijekova dobiva značajno manja pojavnost neučinkovitog odgovora nego kada se koriste nespecifični testovi (Michelson, 2006; Tantry 2005; Siedel 2011). Ovo je stoga jedan od važnih razloga zbog kojeg je pri primjeni agregometrije u praćenju antiagregacijske terapije važno koristiti specifične agoniste za odgovarajući lijek. Potencijalni uzroci, odnosno, mehanizmi interindividualne varijabilnosti i neučinkovitog odgovora na dvije glavne skupine antiagregacijskih lijekova (inhibitor COX-1 enzima i inhibitore ADP receptora) prikazani su u Tablici 2. Glavni uzroci značajnih interindividualnih varijabilnosti koje mogu rezultirati neučinkovitim odgovorom na liječenje u pojedinim bolesnika za obe skupine lijekova su smanjena bioraspoloživost lijeka, interakcije s drugim lijekovima, polimorfizmi ciljnih enzima ili receptora ili alternativni putevi pojačanog izražaja ili sinteze enzima ili agonista (Tablica 2).

Tablica 2. Mehanizmi interindividualne varijabilnosti i neučinkovitog odgovora na antiagregacijsku terapiju.

Inhibitor COX-1 enzima (ASA)	<ul style="list-style-type: none"> • Smanjena bioraspoloživost lijeka (neadekvatna doza, neredovito uzimanje, slaba apsorpcija ASA iz GIT-a) • Interferencija s drugim lijekovima (nesteroidni protuupalni lijekovi, NSAIDs) mehanizmom kompeticije sprječavaju inhibiciju COX-1 enzima • Nepotpuna inhibicija sinteze TXA2 • Povećana osjetljivost trombocita na ADP i kolagen • Polimorfizmi u genima za trombocitne receptore (GP IIb/IIa, TXA2 receptor) i enzime (COX-a, COX-2, TXA2-sintaza) • Povećana sinteza TXA2 alternativnim putevima (preko COX-2 enzima) u stanjima ubrzane izmjene trombocita u cirkulaciji • Pojačani izražaj COX-2 enzima u stanjima stresa, upale ili infekcije u trombocitima, monocitima, makrofagima i endotelnim stanicama
Inhibitori ADP receptora (klopidogrel, prasugrel, tikagrelor)	<ul style="list-style-type: none"> • Smanjena bioraspoloživost lijeka (neredovito uzimanje, preniske ili neodgovarajuće doze, varijabilna crijevna apsorpcija (npr. pretili osobe trebaju veće doze) • Interferencija s drugim lijekovima koji se također metaboliziraju putem citokroma P450 (benzodiazepini, statini) - lijekovi iz skupine tienopiridina • Polimorfizmi enzima citokroma P450: CYP2C19 (klopidogrel); CYP3A4 (prasugrel) - promijenjen odgovor na lijek • Polimorfizam P2Y12 receptora (H2 haplotip receptora) - povećan broj receptora i posljedično smanjen učinak lijeka • Pojačano oslobađanje ADP-a • Alternativni putevi aktivacije trombocita (preko P2Y1 receptora)

Preuzeto iz: Margetić S. Agregacija trombocita. Kako, kada i zašto mjeriti. U: Getaldić i sur. Trombociti - interdisciplinarni pristup, Zagreb, Medicinska naklada, 2017; str: 49-68.

ASA - acetilsalicilna kiselina (engl. *acetylsalicylic acid*); COX - ciklooksigenaza; GIT - gastrointestinalni trakt; TXA2 - tromboksan A2; ADP - adenzin difosfat; GP IIb/IIIa - glikoproteinski kompleks receptora IIb/IIIa

1.5. Agregometrija trombocita u praćenju antiagregacijske terapije

Kontinuirani porast primjene antiagregacijskih lijekova u kardioloških i neuroloških bolesnika iz godine u godinu nametnuo je i potrebu za uvođenjem pretraga agregacije trombocita u svrhu procjene učinkovitosti liječenja ovim lijekovima. Sama primjena pretraga agregacije trombocita u bolesnika na antiagregacijskoj terapiji temelji se na činjenici da se mjerenjem funkcije trombocita *in vitro* može procijeniti stupanj inhibicije ostvaren djelovanjem lijeka.

Ciljevi primjene agregometrije trombocita u procjeni učinkovitosti antiagregacijske terapije su višestruki. Osnovni ciljevi jesu ispitati terapijsku učinkovitost lijeka, predvidjeti sekundarne ishemijske događaje te spriječiti komplikacije vezane uz antiagregacijske lijekove, u prvom redu krvarenja (Siedel, 2011). Nadalje, smatra se da primjena pretraga agregacije trombocita može pomoći u individualnom pristupu terapiji pri čemu bi određivanje vrste i doze lijeka omogućilo veću učinkovitost u sprječavanju ishemijskih događaja, a bez povećanog rizika za krvarenje (Samos, 2014).

Jedan od osnovnih pristupa u primjeni pretraga agregacije trombocita u svrhu praćenja antiagregacijske terapije je korištenje specifičnog agonista agregacije za određenu skupinu lijekova (Siedel, 2011). Tako se kod bolesnika koji su na terapiji inhibitorima enzima COX-1 kao specifičan agonist koristi AA, a kod inhibitora ADP receptora specifičan agonist je ADP. Kod kombinirane ili dvojne terapije s obje navedene skupine lijekova agregabilnost trombocita se određuje uz oba navedena agonista, AA i ADP.

Primjena agonista specifičnog za određenu skupinu antiagregacijskih lijekova u procjeni učinkovitosti liječenja važna je zbog nekoliko razloga. Tako su dosadašnja istraživanja pokazala da jedino primjena testova koji mjere specifično djelovanje lijeka na farmakološki cilj omogućuje pouzdanu procjenu učinka lijeka. Samo testovi koji mjere farmakološki učinak određenog lijeka usmjeren na specifičan cilj mogu utvrditi da li je pojačana reaktivnost trombocita rezultat nedovoljne farmakološke inhibicije. Nadalje, samo specifičan test može identificirati i one bolesnike koji "prekomjerno" reagiraju na lijek te stoga imaju preisku ostatnu reaktivnost trombocita koja povećava rizik za krvarenje (Siedel, 2011).

Drugi važan razlog odnosi se na određivanje neučinkovitog odgovora na lijek. Tako se u literaturi navode različiti podaci o učestalosti neučinkovitog odgovora na lijek, što značajno ovisi i o metodi koja se koristi. Primjenom metoda uz specifičan agonist dobiva se značajno manja pojavnost neučinkovitog odgovora nego kada se koriste nespecifični testovi.

1.5.1. Primjena agregometrije trombocita za procjenu oporavka funkcije trombocita nakon ukidanja antiagregacijske terapije

Sve učestalija primjena antiagregacijske terapije u prevenciji i liječenju arterijske tromboze nametnula je još jednu kliničku indicaciju za izvođenje pretraga agregacije trombocita, a koja se odnosi na procjenu oporavka funkcije trombocita nakon ukidanja antiagregacijske terapije prije operativnog zahvata. U brojnim kirurškim specijalnostima, u prvom redu kardiokirurgiji i neurokirurgiji, ali i prije brojnih drugih opsežnih operativnih zahvata kod kojih postoji visok rizik krvarenja, primjena antiagregacijskih lijekova, posebice onih koji su snažni inhibitori trombocitne funkcije (npr. inhibitori ADP receptora), ukida se prije operativnog zahvata kako bi se rizik krvarenja sveo na minimum (Korte, 2011). Stoga je nakon prijeoperativnog isključivanja antiagregacijskih lijekova potrebno utvrditi da li je došlo do fiziološkog oporavka funkcije trombocita u cilju izbjegavanja prekomjernog krvarenja i posljedične masivne transfuzije krvnih pripravaka. Pretrage agregacije trombocita u praćenju učinkovitosti antiagregacijske terapije, kao i u navedenoj kliničkoj indicaciji praćenja oporavka trombocita nakon ukidanja ove terapije, danas izvode samo u rijetkim laboratorijima, u prvom redu zbog nedostupnosti analitičkih sustava za mjerenje agregacije trombocita u većini bolničkih ustanova. Međutim, s obzirom na važnost pouzdane procjene adekvatne funkcije trombocita u bolesnika prethodno liječenih antiagregacijskim lijekovima koji se spremaju za opsežne operativne zahvate, kao i zbog istodobne primjene brojnih drugih lijekova (koji ne spadaju u antiagregacijske), a koji također mogu značajno utjecati na funkciju trombocita (analgetici, antiepileptici), za očekivati je da će u budućnosti pretrage agregacije trombocita imati sve veću primjenu i u ovim kliničkim stanjima.

Pri izvođenju pretraga agregacije trombocita s ciljem procjene oporavka njihove funkcije nakon ukidanja antiagregacijskog lijeka, potrebno je imati na umu da antiagregacijski lijekovi ostvaraju svoj farmakološki učinak na trombocite tijekom njihova cijelog života u cirkulaciji, što u prosjeku iznosi oko 10 dana. Budući da dnevno u cirkulaciju dopijeva oko 10% od ukupnog broja trombocita, smatra se da je u prosjeku potrebno oko 5-6 dana da se funkcija cirkulirajućih trombocita oporavi za oko 50% nakon prestanka uzimanja antiagregacijskih lijekova.

1.5.2. Obilježja metoda agregometrije u praćenju antiagregacijske terapije

Jedan od važnih problema u implementaciji agregometrije trombocita u praćenju antiagregacijske terapije je i nestandardiziranost zbog postojanja različitih metodologija i analitičkih sustava. Klasične metode mjerenja agregacije, kao što su klasična optička i impedancijska agregometrija, zbog svoje složenosti uglavnom nisu prikladne za brzu dijagnostiku, izvan specijaliziranih koagulacijskih laboratorija te za obradu velikog broja uzoraka. Nasuprot ovim metodama su osmišljeni brojni novi sustavi za mjerenje agregacije trombocita te postoje mali prijenosni analizatori, prikladni za brzu dijagnostiku, kao *point of care analizatori* za brzu dijagnostiku u uzorku pune krvi uz jednostavno rukovanje. Međutim, niti ovi sustavi nisu standardizirani pa neusporedivost rezultata dobivenih različitim metodama otežava i njihovu primjenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi (Siedel, 2011; Gachet, 2008).

Općenito, na temelju dosadašnjih istraživanja pojedinih metoda u primjeni agregometrije trombocita u bolesnika na antitrombocitnoj terapiji može se zaključiti da je prikladnost primjene pojedine metode agregometrije u praćenju učinkovitosti antiagregacijske terapije određena s tri najvažnija obilježja same metode:

1. da metoda omogućuje primjenu specifičnog agonista za odgovarajuću skupinu lijekova: arahidonske kiseline kao agonista za lijekove iz skupine inhibitora COX-1 enzima i ADP agonista za lijekove iz skupine ADP receptora
2. da se metodom mogu predvidjeti glavni nepovoljni klinički ishodi (krvarenje ili tromboza) ili tzv. MACE, engl. *major adverse clinical events*
3. da je metoda brza i jednostavna za izvedbu, odnosno prikladna za primjenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi u praćenju bolesnika na antiagregacijskoj terapiji

Osnovna obilježja pojedinih metoda agregometrije u praćenju antiagregacijske terapije prikazana su u Tablici 3.

Tablica 3. Obilježja pojedinih metoda agregometrije u praćenju antiagregacijske terapije.

<p>Inhibitor COX-1 enzima (ASA)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • PFA-100 uz KOL/EPI test može predvidjeti MACE, ali je nedovoljno osjetljiv test (nemaju svi bolesnici produžen KOL/EPI test), na test utječu drugi čimbenici neovisni o TXA2 (Hct, broj Trc-a, aktivnost vWF u plazmi). Zbog navedenih nedostataka potrebno je odrediti test prije i nakon uvođenja terapije jer odgovor na ASA može biti neadekvatno interpretiran ukoliko se test izvodi samo nakon uvođenja terapije • Optička agregometrija uz agonist AA može predvidjeti MACE, ali složenost metode (dugotrajna i tehnički zahtjevna pretraga uz pripremu uzorka PRP-a i potreban veliki volumen uzorka) otežava primjenu u svakodnevnoj praksi • VerifyNow test uz agonist AA može predvidjeti MACE, osjetljiv je i specifičan test za praćenje ASA • MULTI PLATE uz agonist AA može predvidjeti MACE, metoda je prikladna za svakodnevnu primjenu • IMPACT ne predviđa MACE, nije prikladna metoda za praćenje ASA • Impedancijska agregometrija uz agonist AA može predvidjeti MACE, ali je nedovoljno ispitana u praćenju terapije aspirinom, izvodi se u uzorku pune krvi, te iako je manje tehnički zahtjevna u odnosu na optičku metodu također treba veliku količinu uzorka • PlateletWorks je nedovoljno ispitana metoda, kliničku primjenu ograničava potreba za analizom neposredno nakon uzorkovanja (unutar nekoliko minuta)
<p>Inhibitori ADP receptora (klopidogrel, prasugrel, tikagrelor)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • PFA-100 uz P2Y - različiti literaturni podatci koji se odnose na osjetljivost i specifičnost testa za praćenje terapije inhibitorima ADP receptora • VerifyNow test uz agonist ADP može predvidjeti MACE, osjetljiv je i specifičan test za praćenje • Optička agregometrija uz agonist ADP može predvidjeti MACE, ali metoda nije specifična za P2Y₁₂ receptor; složenost metode (dugotrajna i tehnički zahtjevna pretraga uz pripremu PRP-a, potreban je veliki volumen uzorka) otežava primjenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi • MULTIPLATE uz agonist ADP predviđa MACE, metoda je prikladna za svakodnevnu primjenu • Impedancijska agregometrija uz agonist ADP je nedovoljno ispitana u praćenju terapije inhibitorima ADP receptora • PlateletWorks je nedovoljno ispitana metoda, kliničku primjenu ograničava potreba za analizom neposredno nakon uzorkovanja (unutar nekoliko minuta) • IMPACT je slabo ispitana metoda u bolesnika na inhibitorima ADP receptora

Prema: Margetić S. Agregacija trombocita. Kako, kada i zašto mjeriti. U: Getaldić i sur. Trombociti - interdisciplinarni pristup, Zagreb, Medicinska naklada, 2017; str: 49-68.

ASA-acetilsalicilna kiselina (engl. *acetylsalicylic acid*); COX - ciklooksigenaza; MACE - glavni nepovoljni klinički ishodi (engl. *major adverse clinical events*); KOL - kolagen; EPI - epinefrin; TXA2 - tromboksan A2; Hct - hematokrit, Trc - trombociti; vWF - von Willebrandov čimbenik (engl. *von Willebrand factor*); AA - arahidonska kiselina (engl. *arahidonic acid*); ADP - adenzin-difosfat; PRP - plazma bogata trombocitima (engl. *platelet rich plasma*).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kako je već u uvodnom dijelu ovog rada objašnjeno, zbog ključne uloge trombocita u nastanku i progresiji arterijske tromboze, njezina prevencija i liječenje uvelike se temelje na primjeni antiagregacijskih (antitrombocitnih) lijekova koja danas predstavlja najšire primjenjivani terapijski pristup navedenim kliničkim stanjima u razvijenim zemljama. Kontinuiran i značajan porast primjene ovih lijekova proteklih godina, nametnuo je i potrebu za primjenom agregometrije trombocita u praćenju učinkovitosti liječenja antiagregacijskim lijekovima. Primjena agregometrije trombocita u praćenju antiagregacijske terapije još uvijek nije dio svakodnevne, rutinske dijagnostike te se još uvijek najčešće izvodi isključivo u sklopu različitih istraživanja.

Cilj rada: ispitati utjecaj antiagregacijskih lijekova na agregabilnost trombocita uz primjenu specifičnih agonista za pojedinu skupinu lijekova metodom optičke agregometrije na analitičkom sustavu Sysmex CS-2500, Siemens, Njemačka.

Specifični ciljevi:

1. Ispitati stupanj inhibicije agregabilnosti trombocita uz specifične agoniste agregacije: AA u bolesnika na terapiji inhibitorima COX-1 enzima i ADP u bolesnika na terapiji lijekovima koji djeluju kao inhibitori ADP receptora
2. Ispitati postoji li statistički značajna razlika u inhibiciji agregacije trombocita između pojedinih skupina inhibitora COX-1 enzima (andol i aspirin)
3. Usporediti i obrazložiti stupanj inhibicije agregabilnosti trombocita primjenom dvije različite skupine lijekova tj. inhibitora COX-1 enzima i inhibitora ADP receptora
4. Ispitati minimalno vrijeme potrebno za uspostavljanje normalne funkcije trombocita nakon prestanka uzimanja pojedinih antiagregacijskih lijekova (inhibitori COX-1 enzima i inhibitori ADP receptora)

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U ispitivanje je bilo uključeno ukupno 105 ispitanika liječenih jednostrukom ili kombiniranom antiagregacijskom terapijom, od čega je 48 bolesnika bilo je liječeno samo ASA-om, 50 dvojnomo terapijom (inhibitor COX-1 enzima i inhibitor ADP receptora) i 7 bolesnika samo inhibitorima ADP receptora. Dodatno, u ispitivanju je sudjelovalo 70 ispitanika kod kojih je antiagregacijska terapija ukinuta prije operativnog zahvata. Uzorci ispitanika analizirani su na Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju Kliničkog zavoda za kemiju, Klinički bolnički centar "Sestre milosrdnice". Određivanje agregacije trombocita u bolesnika uključenih u ispitivanje činilo je sastavni dio rutinske dijagnostike u Odjelu za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju, te su rezultati pretraga dobiveni rutinskom dijagnostikom korišteni za izradu ovog diplomskog rada.

3.2. Uzorci

Za pretrage optičke agregometrije uz agoniste agregacije trombocita AA i ADP uzorkovane su 2 epruvete venske krvi (Vacutainer, Becton Dickinson) uz antikoagulans 3,2 %-tni (109 mM) natrijev citrat (epruvete s plavim čepom koje se koriste za koagulacijske pretrage). Analitički uzorak za pretrage agregacije trombocita je plazma bogata trombocitima (PRP, engl. *platelet rich plasma*), dobiven centrifugiranjem uzorka pune krvi na način kako je opisano u odjeljku 3.3.1.1. Dodatnim centrifugiranjem jednog spremnika uzorkovane pune krvi priređuje se i uzorak plazme siromašne trombocitima (PPP, engl. *platelet poor plasma*) koji u postupku mjerenja služi kao slijepa proba za podešavanje transmisije svjetla za svaki pojedini uzorak.

3.3. Metode

Pretrage agregacije trombocita učinjene su na analitičkom sustavu Sysmex CS-2500 (Siemens Healthineers, Njemačka). Analizator Sysmex CS-2500 je potpuno automatizirani analitički sustav primarno namijenjen izvođenju automatiziranih pretraga zgrušavanja i fibrinolize. Analizator radi na načelu optičkog mjerenja koagulometrijskih, kromogenih i imunokemijskih metoda detekcije reakcije, a dodatno ima ugrađen programski paket koji omogućuje i određivanje agregacije trombocita optičkom metodom (Slika 9).

Pretrage agregacije trombocita na analitičkom sustavu Sysmex CS-2500 moguće je izvoditi uz pet različitih agonista agregacije: ADP, kolagen, epinefrin, arahidonska kiselina i ristocetin, korištenjem komercijalnih reagensa tvrtke Hyphen (BioMed, Francuska). Za potrebe ovog rada korišteni su agonisti agregacije ADP i arahidonska kiselina (AA) kao specifični agonisti za dvije skupine antiagregacijskih lijekova (inhibitori COX-1 enzima i inhibitori ADP receptora) koji su predmet izrade ovog rada.



Slika 9. Automatizirani analitički sustav za izvođenje pretraga hemostaze Sysmex CS-2500 (Siemens Healthineers, Njemačka)

Za centrifugiranje pune krvi u svrhu dobivanja uzoraka PRP-a i PPP-a korištena je centrifuga Hettich Universal 320R (Hettich, Njemačka).

Za određivanje broja trombocita u analitičkom uzorku PRP-a korišten je hematološki brojač Sysmex XN 1000 (Sysmex, Japan).

3.3.1. Optička agregometrija na analitičkom sustavu Sysmex CS -2500

Cjelokupni postupak izvođenja optičke agregometrije trombocita sastoji od nekoliko radnih procesa koji uključuju pripremu analitičkog uzorka PRP-a te pripremu PPP-a, određivanje broja trombocita na hematološkom brojaču, a potom i sam postupak izvođenja pretraga agregacije trombocita na analitičkom sustavu. Reagensi i ostali pribor za izvođenje pretraga agregacije na CS-2500 analizatoru prikazan je u Tablici 4.

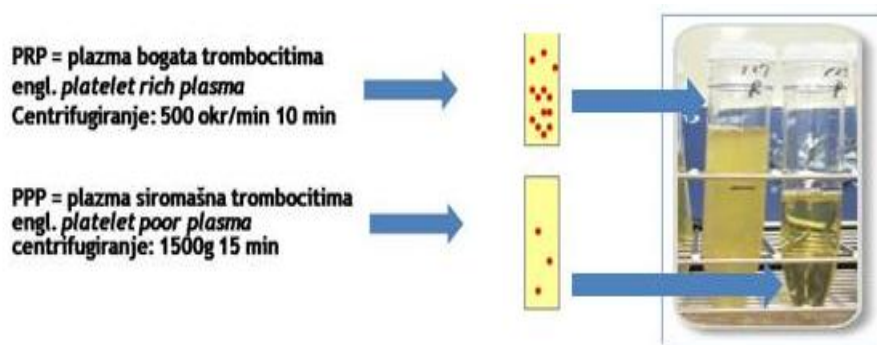
Tablica 4. Reagensi i ostali pribor za izvođenje pretraga agregacije trombocita na CS2500 analizatoru.

Pribor – namjena i pakiranje
1. ADP reagens - Hyphen BioMed ADP (3x0.5 mL)
2. Arahidonska kiselina reagens - Hyphen BioMed Arachidonic acid (3x0.5 mL)
3. SB Cuvettes-Stirrerbar – reakcijske kivete s metalnim štapićem za pretrage agregacije trombocita (1x144 kom)
4. Reakcijske kivete obične (bez metalnog štapića) - 3x1000 kom.
5. Sample Cups Conical 4 mL – čašice za uzorke i reagense (200 kom)
6. Destilirana voda – za otapanje reagensa (500 mL)
7. Fiziološka otopina, NaCl 0,9% – za pripremu radne otopine reagensa (500 mL)
8. Clean I cleaning solution – otopina za ispiranje koja sadrži natrijev hipoklorit (100 mL)
9. Clean II cleaning solution – otopina za ispiranje koja sadrži kiselo sredstvo za čišćenje (100 mL)
10. Adapteri u pozicijama nosača za reagense (5 kom)

3.3.1.1. Priprema uzoraka PRP-a i PPP-a

Epruvete sa uzorkovanom venskom krvi centrifugiraju se na 500 okr/minuti 10 minuta kako bi se dobio analitički uzorak PRP-a koji služi kao analitički za mjerenje optičke agregacije trombocita (Slika 10). Nakon opisanog načina centrifugiranja jedan spremnik s dobivenim PRP-om se dodatno centrifugira na 4000 okr/min 10 minuta kako bi se dobio uzorak plazme PPP-a (Slika 10).

Dobiveni uzorak PRP-a pipetira se u originalnu čašicu za uzorke (*Conical cup 4 mL*, Siemens, Njemačka) koja se označi oznakom PRP i identifikacijskim brojem (ID) uzorka. U drugu čašicu za uzorke pipetira se uzorak PPP-a (volumen 1-2 mL ovisno o raspoloživoj količini), te se ova čašica označi oznakom PPP i identifikacijskim brojem (ID) uzorka.



Slika 10. Priprema uzoraka PRP-a i PPP-a centrifugiranjem venske krvi

3.3.1.2. Određivanje broja trombocita na hematološkom brojaču Sysmex XN 1000

Neposredno nakon pripreme analitičkog uzorka PRP-a, na hematološkom brojaču Sysmex XN 1000 odredi se broj trombocita. Da bi se u uzorku PRP-a izvodila pretraga agregometrije trombocita, broj trombocita ne smije prelaziti $600 \times 10^9/L$. Ukoliko je broj trombocita u navedenom rasponu, ovako dobiven uzorak PRP-a izravno se koristi za pretrage agregacije trombocita na Sysmex CS-2500 analizatoru. Ukoliko je broj trombocita u uzorku veći od navedenog, potrebno je uzorak razrijediti fiziološkom otopinom u omjeru 1:1 te ponovno odrediti broj trombocita na hematološkom brojaču. Ukoliko je broj trombocita u uzorku PRP-a manji od $100 \times 10^9/L$ (uzorak s trombocitopenijom) pretraga optičke agregometrije se može izvoditi, ali je uz rezultat pretrage potrebno izdati napomenu o mogućoj nepouzdanosti nalaza zbog sniženog broja trombocita.

3.3.1.3. Priprema reagensa ADP i arahidonske kiseline (AA)

Reagensi ADP i AA su u liofiliziranom obliku u originalnoj bočici pakiranja reagensa (ADP Hyphen BioMed i AA Hyphen BioMed, Francuska) .

Priprema oba reagensa (ADP i AA) izvodi se na način da se iz hladnjaka uzme originalno pakiranje bočice ADP, odnosno AA reagensa, te se cijeli sadržaj otopi se u 625 μL destilirane vode. Na originalnoj bočici se upiše datum otapanja. Tako priređena primarna otopina ADP i/ili AA reagensa ostavi se 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 30 minuta se iz primarnih otopina ADP i AA reagensa priređuju radne otopine reagensa. Radna otopina ADP reagensa konačne koncentracije 2 $\mu mol/l$, priređuje se na način da se prema Tablici 5. iz primarne otopine pipetira u čašicu za reagense i uzorke (*Conical cup 4 mL*, Siemens, Njemačka) 100

μL ADP reagensa i dodaje se 400 μL fiziološke otopine. Mješavina se pažljivo izmiješa nastavkom na pipeti prije odbacivanja korištenog nastavka u otpad. Ukoliko se priređuje manji volumen radne otopine ADP reagensa otpipetira se 50 μL ADP-a i dodaje se 200 μL fiziološke otopine.

Radna otopina AA reagensa konačne koncentracije 1 $\mu\text{mol/L}$, priređuje se na način da se prema Tablici 5. iz primarne otopine pipetira u čašicu za reagense i uzorke (*Conical cup 4 mL*, Siemens, Njemačka) odgovarajući volumen AA reagensa (100, 150 ili 250 $\mu\text{mol/L}$, ovisno o broju uzoraka) i dodaje se fiziološka otopina (100, 150 ili 250 $\mu\text{mol/L}$). Ovako priređene radne otopine je spremna za postavljanje na analizator i izvođenje pretrage agregacije s ADP-om u uzorcima ispitanika. Ostatak otopljene količine reagensa u originalnoj bočici (primarna otopina reagensa) se odmah nakon pripreme radne otopine vraća u hladnjak na 2-8°C te se koristi za sljedeće pripreme radne otopine ADP reagensa tijekom narednih 27 dana (stabilnost nakon otapanja je 28 dana na temperaturi 2-8°C), te za pripremu radne otopine AA reagensa tijekom narednih 6 dana (stabilnost nakon otapanja je 7 dana na temperaturi 2-8°C). Priređenu primarnu otopinu reagensa dozvoljeno je jednokratno zamrznuti te je zamrznuta na -20°C stabilna 2 mjeseca.

Priređene radne otopine ADP i AA reagensa spremne su za postavljanje na analizator i izvođenje pretrage agregacije s ADP-om i AA u uzorcima ispitanika. Radna otopina oba reagensa stabilna je 10 sati nakon pripreme. Nakon toga se priređena radna otopina ne može se više koristiti za analizu te je u slučaju daljnjeg izvođenja pretraga potrebo prirediti novu radnu otopinu iz primarne otopine reagensa.

Tablica 5. Priprema i stabilnost reagensa za pretrage agregacije trombocita s ADP-om i arahidonskom kiselinom (AA).

Agonist	Adenozin difosfat (ADP)		Arahidonska kiselina (AA)		
PRIPREMA PRIMARNE OTOPINE REAGENSA					
otapanje u	destiliranoj vodi		destiliranoj vodi		
volumen (μL)	625		625		
Stabilnost na 2-8°C	28 dana		7 dana		
18-25°C	24h		24h		
-20°C	2mj		2mj		
PRIPREMA RADNE OTOPINE REAGENSA					
priprema s	fiziološkom otopinom		fiziološkom otopinom		
volumen reagensa (μL)	100	50	250	200	150
volumen fiziološke ot. (μL)	400	200	250	200	150
Koncentracija radne otopine reagensa	2μmol/l		1mmol/l		

3.3.1.4. Postupak izvođenja optičke agregometrije trombocita na analizatoru Sysmex CS2500

3.3.1.4.1. Postavljanje otopina za čišćenje, radnih otopina reagensa ADP i AA, fiziološke otopine (0,9% NaCl) i reakcijskih kiveta u analizator

Usporedo s pripremom uzoraka PRP-a i PPP-a te pripremom radnih otopina pojedinih reagensa (ADP i AA), potrebno je pokrenuti analitički sustav Sysmex CS-2500 za izvođenje pretraga paljenjem nakon čega se u analizator postavljaju detergentsi Clean I i Clean II (Tablica 4). Otopine za čišćenje I i II stavljaju se u analizator nakon paljenja analizatora, a prije početka rada na analizatoru u originalnoj bočici i na odgovarajuće definirane pozicije, a nakon završetka rada i gašenja analizatora pohranjuju se u hladnjaku do slijedeće uporabe.



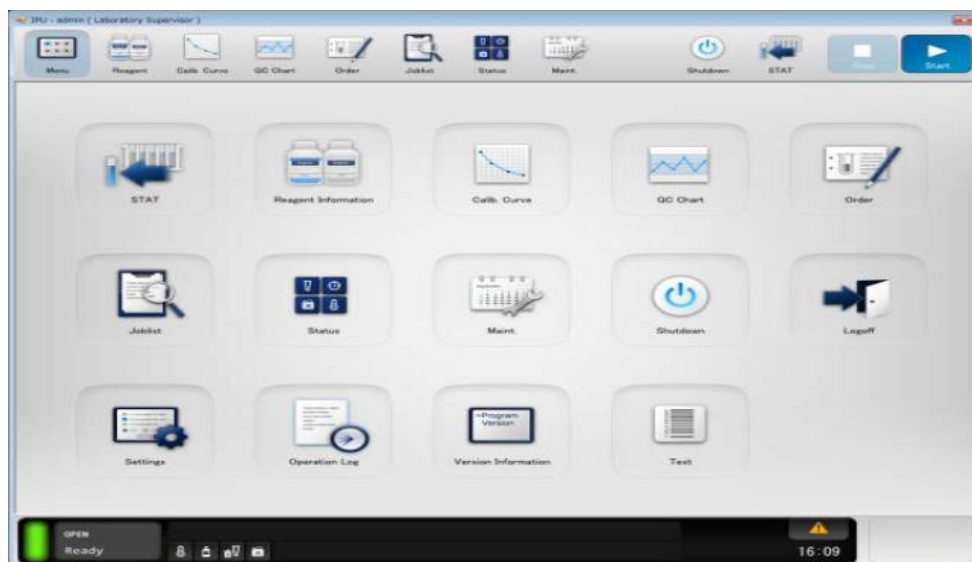
Slika 11. Stavljanje otopine za čišćenje (Cl I) i čašica s radnim otopinama reagensa i fiziološkom otopinom u odgovarajućim adapterima (crni nosači) u analizator

Nakon postavljanja otopina za čišćenje, na odgovarajuće pozicije na analizatoru se postavljaju i prethodno priređene radne otopine reagenasa ADP-a i AA te fiziološka otopina (0,9% NaCl). Svi reagensi i fiziološka otopina se stavljaju u analizator izravno u čašicama za reagense i uzorke (*Conical cup 4 mL*) koje se stavljaju u odgovarajuće adaptere (Slika 11). Potom se u analizator postavljaju i reakcijske kivete s metalnim štapićem (*SB Cuvettes-Stirrerbar*) koje se koriste isključivo za pretrage agregacije trombocita. S obzirom da sadrže metalni štapić na dnu reakcijske kivete, ove se kivete moraju stavljati u analizator na poseban način pomoću plastičnog hvatača (Slika 12). Metalni štapić u reakcijskoj kiveri ima funkciju kontinuiranog miješanja uzorka PRP-a kako bi trombociti mogli agregirati tijekom mjerenja agregacije trombocita.

Sve radne operacije postavljanja otopina, reagenasa i reakcijskih kivetu u analizator obavlja se putem integriranog računala analizatora na način da se za svaku radnu operaciju otvara odgovarajući izbornik na ekranu računala u kojem se zadaje odgovarajuća radnja stavljanja otopina, reagenasa i reakcijskih kivetu (Slika 13).



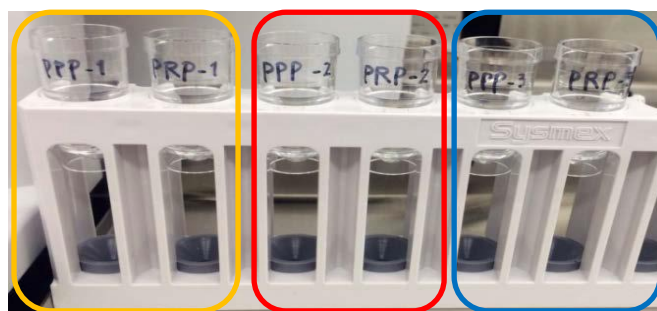
Slika 12. Uzimanje reakcijskih kivetu s magnetnim štapićem pomoću metalnog držača, stavljanje u analizator i prikaz izbornika u analizatoru s postavljenim kivetama



Slika 13. Prikaz glavnih upravljačkih izbornika na ekranu integriranog računala analizatora. Aktivacijom odgovarajućeg izbornika zadaju se pojedine operativne radnje postavljanja reagensa i drugih otopina, reakcijskih kiveta i uzoraka u analizator

3.3.1.4.2. Postavljanje uzoraka PRP-a i PPP-a u analizator

Za svakog ispitanika u analizator se postavljaju odgovarajućim redoslijedom uzorak PRP-a u kojem se određuje agregacija trombocita s odgovarajućim agonistom i uzorak PPP koji služi kao slijepa proba. Uzorci se postavljaju na nosač za uzorke na način da se prvo postavi uzorak PPP-a, a zatim uzorak PRP-a za jednog ispitanika (Slika 14). U računalnom programu analizatora mjerenje agregacije trombocita s odgovarajućim agonistom se istodobno zadaje i za uzorak PPP-a i PRP-a.



Slika 14. Postavljanje uzoraka PRP-a i PPP-a u nosače za uzorke i postavljanje nosača s uzorcima u analizator. Za svaki pojedini uzorak postavlja se uzorak PPP-a i PRP-a tako da se uvijek u nosač prvo stavlja uzorak PPP-a, a potom PRP-a za isti uzorak. Na slici su prikazana ukupno tri uzorka za analizu

3.3.1.4.3. Očitavanje rezultata mjerenja

Svako pojedino mjerenje agregacije trombocita a odgovarajućim agonistom (npr. ADP ili AA) izvodi se tijekom 10 minuta. Analizator automatski izračunava rezultat prema navedenoj formuli u postavkama analizatora kako slijedi:

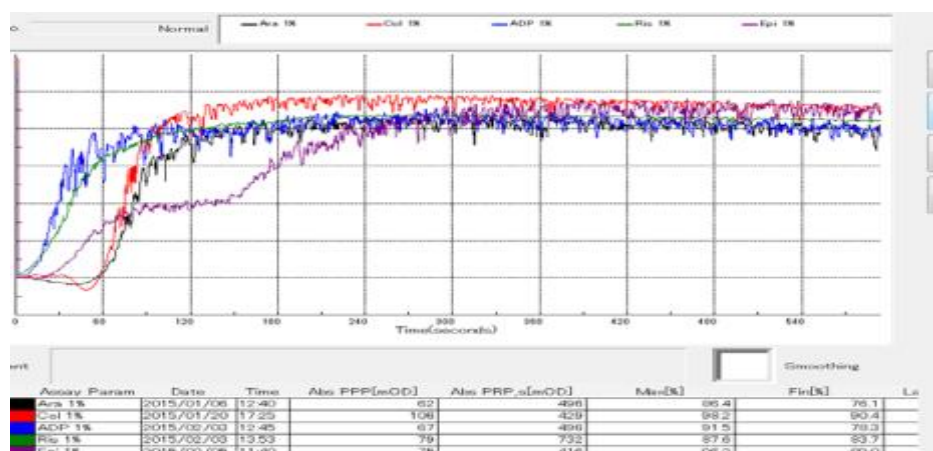
$$\% \text{ agregacije} = \{ [\text{agonist_s}] - [\text{agonist_min}] \} / \{ [\text{agonist_s}] - [\text{PPP}] \} * 100$$

Prema navedenoj formuli, rezultat mjerenja iskazuje se kao brojčana vrijednost tj. **postotak maksimalne agregacije trombocita** iz izmjerenih podataka optičke gustoće (OD, engl. *optical density*), odnosno transmisije svijetla u uzorcima PPP-a i PRP-a.

Status	Rack No. -Pos	Sample No	PPP mOD	ADP1_s mOD	ADP1_min mOD	ADP 1% %	Col1_s mOD	Col1_min mOD	Col 1% %
	000002-01	N1*	71						
	000002-02	N1*		692	407		662	124	
	000002-03	N2*	25						
	000002-04	N2*		527	84		510	90	
		N1*	71	692	407	45.9	662	124	91.0
		N2*	25	527	84	88.2	510	90	88.6

Slika 15. Prikaz brojčanog rezultata mjerenja na ekranu računala analizatora (% agregacije trombocita s ADP-om = 45,9% i 88,2%)

Za svaki analizirani uzorak može se pregledati i odgovarajuća krivulja agregacije (Slika 16).



Slika 16. Prikaz reakcijskih krivulja agregacije trombocita. Reakcijska krivulja za svaki pojedini agonist u jednom uzorku označena je različitom bojom zbog preglednosti

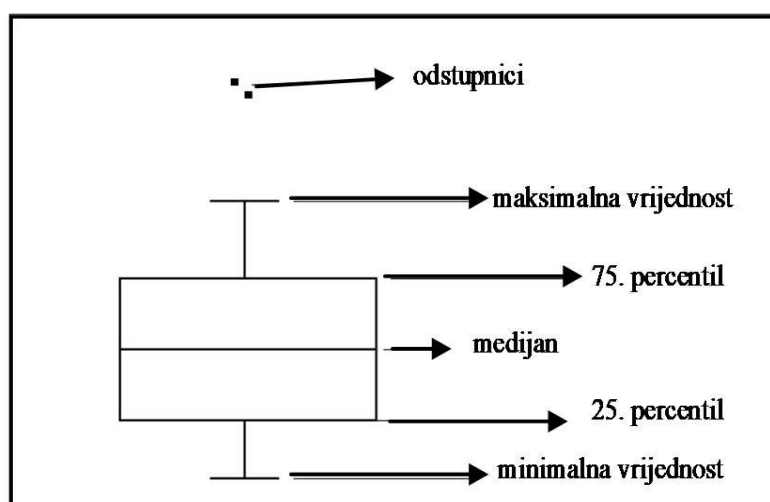
3.4. Statistička obrada rezultata

Pohrana podataka kao i njihova priprema za statističku obradu načinjena je u programu Excel 2003, u sklopu Microsoft Office programskog paketa (Microsoft, SAD). Statističke analize izrađene su u statističkom programskom paketu Med Calc 11.5.0.0. za Windows (MedCalc Software).

Sve rezultate ispitali smo korištenjem deskriptivne (opisne analize) koja je pokazala osnovne značajke varijabli: srednju vrijednost, standardnu devijaciju (SD), medijan i interkvartilni raspon između prvog i trećeg kvartila (IQR, Q1-Q3). Zbog malog broja ispitanika u pojedinim podskupinama ispitanika, rezultate deskriptivne analize prikazali smo medijanom i interkvartilnim rasponom, a sve razlike testirali smo neparametrijskim testovima.

Statističku značajnost razlike između skupina brojčanih podataka testirali smo neparametrijskim Man-Whitney testom koji uspoređuje medijane tj. rangove analiziranih skupina. Vrijednost $P < 0,050$ smatrana je statistički značajnom.

Podatci koji opisuju izmjerene vrijednosti grafički su prikazane grafikonom okvira s ručicama (engl. *Box and Whisker*), kako je prikazano na Slici 17. Ucertani pravokutnik na grafikonu označava izmjerene vrijednosti između 25. i 75. percentila (interkvartilni raspon Q1-Q3), crta unutar pravokutnika označava medijan, a pripadajuće ručice minimalnu i maksimalnu izmjerenu vrijednost za određenu skupinu brojčanih podataka. Točka izvan pravokutnika s ručicama označava vrijednost koja odstupa ili tzv. odstupnik (engl. *outlier*).



Slika 17. Prikaz grafikona okvira s ručicama (engl. *Box and Whisker*)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Deskriptivna statistika i statistička značajnost razlike ispitanih parametara u podskupinama bolesnika liječenih antiagregacijskim lijekovima

Tablica 6. Deskriptivna statistika skupina podataka i statistička značajnost razlike u podskupinama bolesnika na antiagregacijskoj terapiji acetilsalicilnom kiselinom (n=48), inhibitorom ADP receptora (n=7) i dvojnou (kombiniranom) terapijom ASA-om i inhibitorom ADP receptora (n=50).

Lijek	ASA svi bolesnici	ASA Andol 100 mg	ASA Aspirin 100 mg	Dvojna terapija ASA + inhibitor ADP svi	ASA + ADP inhibitor Klopidogrel 75 mg	ASA + ADP inhibitor Tikagrelor* 90 mg	ADP inhibitor svi bolesnici **
Broj uzoraka	48	21	27	50	42	8	7
AA%							
Medija	10,0	12,0	10,0	9,0	9,0	6,0	---
n	7,7 - 12,7	10,0 - 17,3	5,0 - 14,1	6,0 - 10,0	6,0 - 13,0	1,0 - 14,2	---
95%CI							----
IQR	5,0 - 18,0	9,5 - 18,0	4,3 - 23,8	5,0 - 15,0	5,0 - 15,0	3,0 - 10,0	
P = 0,407				P = 0,372			
				P = 0,109			
ADP%							
Medija				32,0	35,0	25,0	21,0
n				26,0 - 37,2	29,2 - 40,8	11,1 - 29,6	7,5 - 49,0
95%CI	----	----	----				
IQR				22,0 - 42,5	22,0 - 44,0	16,0 - 27,5	1,00-43,0
				P = 0,022			
				P = 0,290			
				P = 0,908			

* komercijalno ime lijeka tikagrelora je Brilique

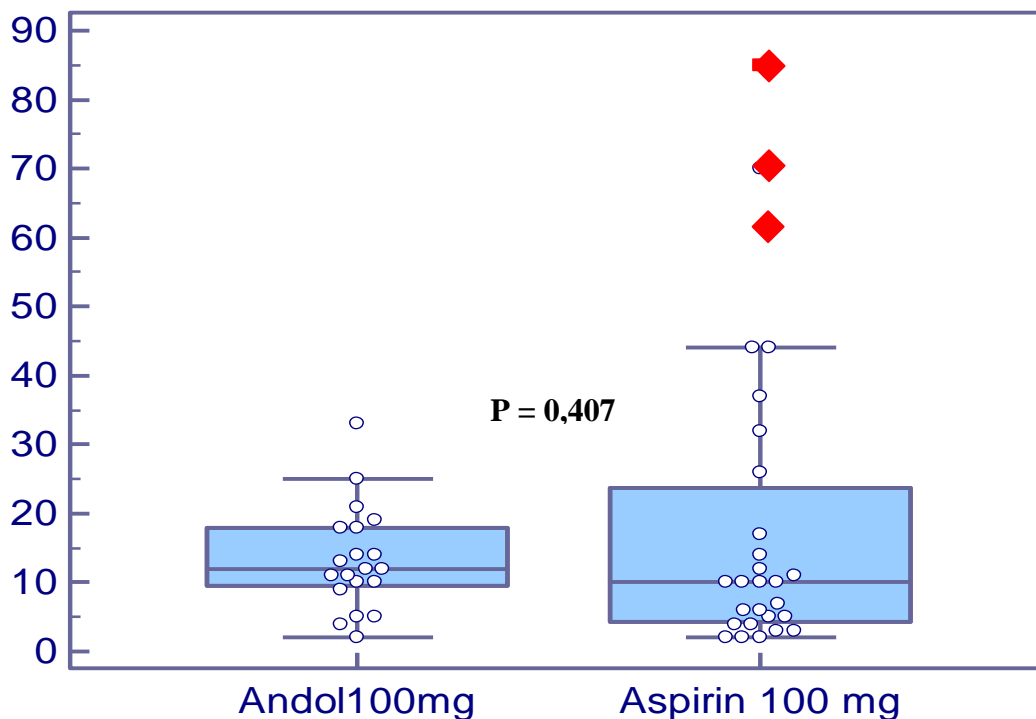
** od ukupno 7 bolesnika, 2 su liječena tikagrelorom i 5 bolesnika klopidogrelom

Rezultati ispitivanja agregabilnosti trombocita s obje skupine antiagregacijskih lijekova pokazali su značajno snižene vrijednosti agregacije trombocita izmjerene primjenom specifičnog agonista za pojedinu skupinu lijekova u odnosu na deklarirane vrijednosti agregacije trombocita u zdravih odraslih osoba za odgovarajući agonist (referentni interval za agoniste agregacije AA i ADP je vrijednost veća od 60%).

Vrijednosti agregacije trombocita uz agonist AA nisu se statistički značajno razlikovale između bolesnika liječenih različitim komercijalnim lijekovima iz skupine inhibitora COX-1 enzima (andol i aspirin) u podskupini bolesnika liječenih samo inhibitorima COX-1 enzima ($P = 0,407$). Nadalje, vrijednosti agregacije trombocita uz agonist AA pokazale su istovjetne vrijednosti (medijan = 9%, IQR = 5 - 15%) između bolesnika liječenih samo lijekom iz skupine inhibitora COX-1 enzima i bolesnika na dvojnjoj (kombiniranoj) terapiji ($P = 0,372$). Između bolesnika liječenih dvojnjom terapijom uz lijek klopido­grel i tikagrelor, vrijednosti agregacije uz agonist AA pokazale su niže vrijednosti u podskupini bolesnika koji su uz ASA uzimali tikagrelor (medijan 6%, uz 95% CI = 1 – 14%), u odnosu na bolesnike na klopido­grelu (medijan 9% uz 95% CI = 6 – 13%), ali niti među ovim bolesnicima razlika u agregabilnosti uz agonist AA nije bila statistički značajna ($P = 0,109$).

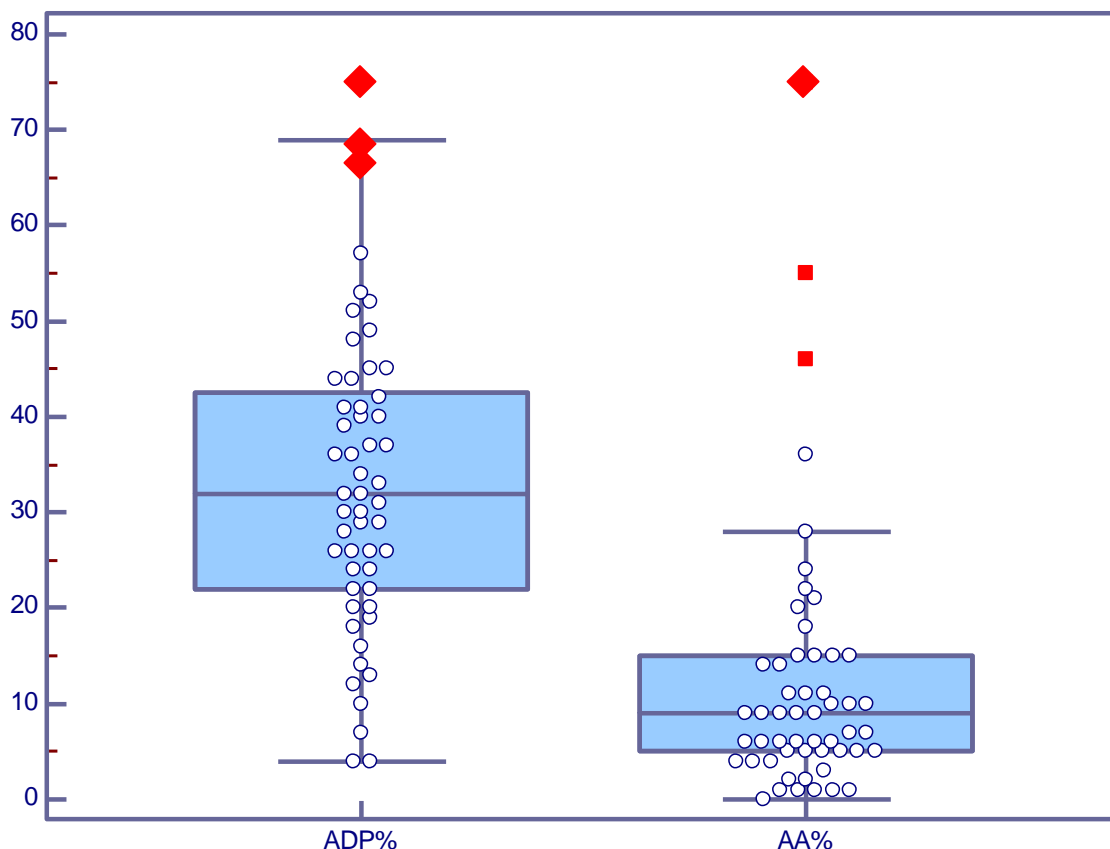
U podskupini bolesnika liječenih dvojnjom (kombiniranom) terapijom (inhibitor COX-1 enzima i inhibitor ADP receptora), vrijednosti agregacije trombocita pokazale su značajno niže vrijednosti ($P = 0,022$) u bolesnika liječenih tikagrelorom u odnosu na bolesnike iste podskupine koji su liječeni klopido­grelom.

Nadalje, u podskupini bolesnika na terapiji samo inhibitorima ADP receptora, koju je činila najmanja skupina od samo 7 bolesnika, izmjerene vrijednosti agregacije trombocita bile su niže u odnosu na vrijednosti agregacije trombocita uz ADP agonist u bolesnika na dvojnjoj terapiji, ali razlika u vrijednostima nije bila statistički značajna ($P = 0,290$), kao niti među podskupinama bolesnika liječenih samo inhibitorima ADP receptora i svih bolesnika na dvojnjoj terapiji ($P = 0,908$) (Tablica 6).



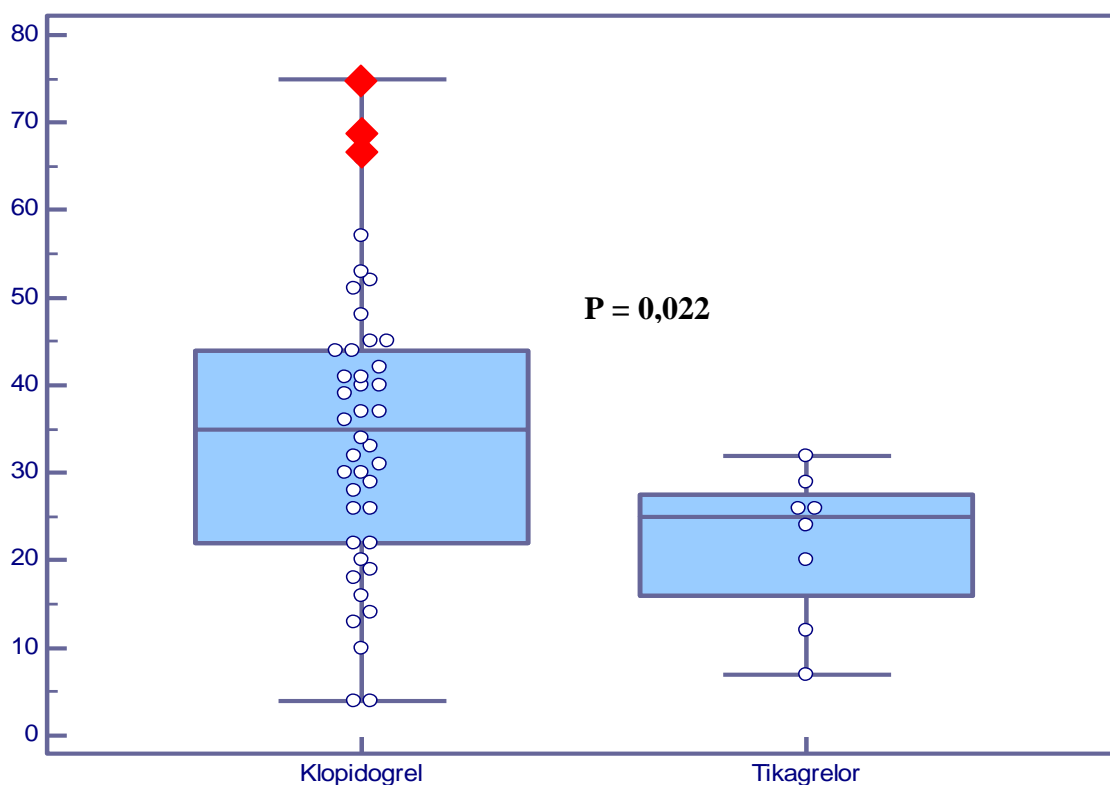
Slika 18. Grafički prikaz vrijednosti agregacije trombocita uz agonist arahidonsku kiselinu (AA) u bolesnika liječenih andolom 100 mg (n = 21) i aspirinom 100 mg (n=27)

U podskupini bolesnika liječenih inhibitorima COX-1 enzima (andol i aspirin), od ukupnog broja bolesnika (n = 48), kod 3 bolesnika ($3/48 = 0,06$) liječenih aspirinom 100 mg, izmjerene vrijednosti agregacije trombocita uz AA agonist (označene crvenim rombom) bile su iznad donje granice referentnog intervala ($>60\%$). Niti jedan bolesnik liječen andolom 100 mg nije imao vrijednost agregacije u području referentnog intervala ($>60\%$). Uz izuzetak navedena tri bolesnika na aspirinu 100 mg, svi ostali bolesnici (n = 45) liječeni s oba komercijalna lijeka (andol i aspirin) imali su značajno snižene vrijednosti agregacije trombocita uz agonist AA (Slika 18).



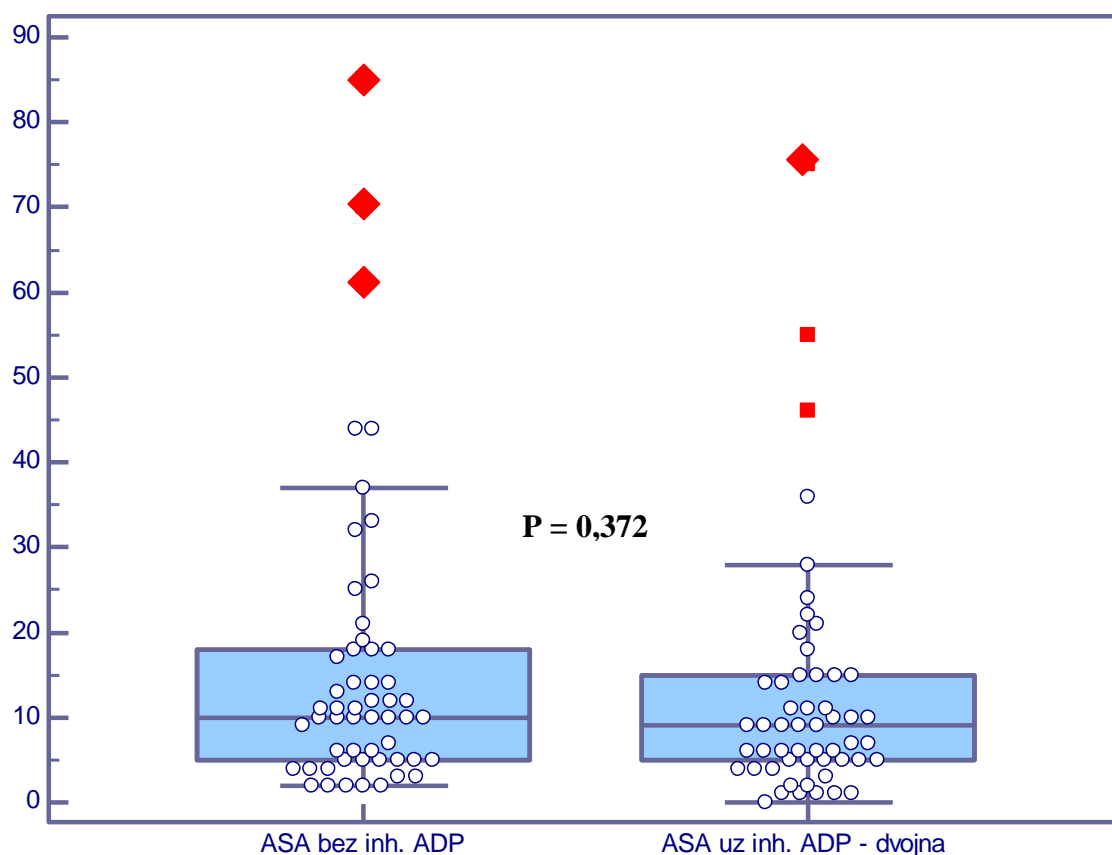
Slika 19. Grafički prikaz vrijednosti agregacije trombocita uz agoniste ADP i arahidonsku kiselinu (AA) u ukupnoj podskupini bolesnika na dvojnjoj (kombiniranoj) antiagregacijskoj terapiji (n = 50)

U bolesnika liječenih dvojnomo (kombiniranom) terapijom, od ukupnog broja bolesnika (n = 50), kod $3/50 = 0,06$ vrijednost agregacije trombocita uz agonist ADP bila je iznad donje granice referentnog intervala ($> 60\%$) tj. s vrijednostima 66%, 69% i 75% (točke označene crvenim rombom). Dok je jedan od ukupno 50 bolesnika ($1/50 = 0,02$) imao izmjerene vrijednosti agregacije uz AA agonist (75%) iznad donje granice referentnog intervala (točka označena crvenim rombom) (Slika 19). Vrijednosti agregacije trombocita uz ADP i AA agoniste unutar referentnog intervala izmjerene su u različitim bolesnika unutar iste podskupine.



Slika 20. Grafički prikaz vrijednosti agregacije trombocita uz agonist ADP u podskupini bolesnika liječenih dvojnomo (kombiniranom) terapijom, a ovisno o vrsti lijeka iz skupine inhibitora ADP receptora: klopido­grel (n = 42) i tikagrelor (n = 8)

U podskupini bolesnika liječenih samo inhibitorom ADP receptora (n = 7), kao i u bolesnika na dvojnomoj terapiji koji su liječeni tikagrelorom (n = 8) svi su bolesnici imali vrijednosti agregacije trombocita ispod donje granice referentnog intervala (>60%). U usporedbi s bolesnicima na dvojnomoj terapiji kod kojih je u tri bolesnika vrijednost agregacije trombocita uz ADP agonist bila iznad donje granice referentnog intervala (>60%), kako je prikazano na Slici 20., a sva tri slučaja činili su bolesnici liječeni klopido­grelom. Izmjerene vrijednosti agregacije uz ADP agonist u tri bolesnika s vrijednostima unutar referentnog intervala iznosile su 66, 69 i 75% (Slika 20).



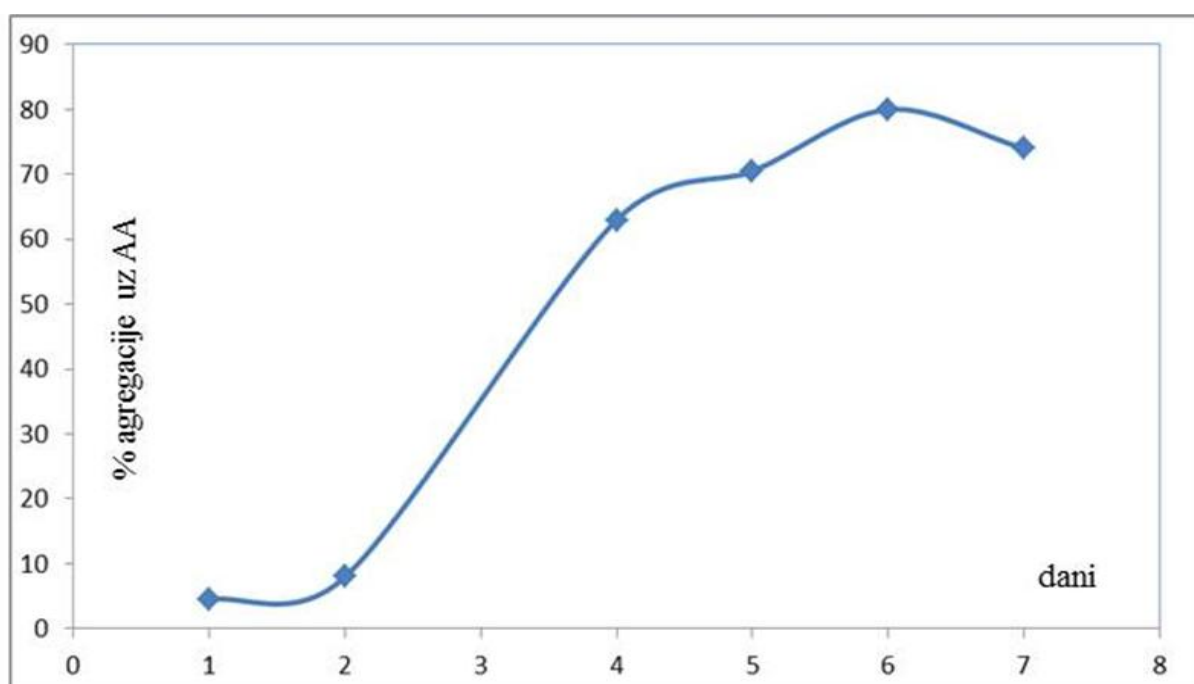
Slika 21. Grafički prikaz vrijednosti agregacije trombocita uz agonist AA u podskupinama bolesnika liječenih samo ASA-om (n = 48) i liječenih dvojnog (kombiniranom) terapijom (n=50)

Vrijednosti agregacije trombocita uz agonist AA nisu se značajno razlikovale između podskupina bolesnika liječenih samo lijekom iz skupine inhibitora COX-1 enzima (ASA bez inh. ADP) i bolesnika na dvojnog terapiji (ASA uz inh. ADP - dvojna). Od ukupnog broja bolesnika, u podskupini bolesnika liječenih samo ASA-om kod tri bolesnika su izmjerene vrijednosti agregacije unutar referentnog intervala, dok je u podskupini bolesnika liječenih dvojnog terapijom, samo jedan bolesnik imao vrijednost agregacije uz agonist AA unutar referentnog intervala (75%) (Slika 21).

4.2 Vrijednosti agregacije trombocita u bolesnika na antiagregacijskoj terapiji ASA ili inhibitorima ADP receptora kod kojih je navedena terapija ukinuta zbog operativnog zahvata

Tablica 7. Vrijednosti agregacije trombocita uz agonist arahidonsku kiselinu (AA) u bolesnika kod kojih je antiagregacijska terapija acetilsalicilnom kiselinom (ASA) ukinuta od 1 do 7 dana.

Broj dana bez terapije	Broj uzoraka (n)	AA Median (%)	AA IQR (%)
1	10	4,5	2,0 - 10,0
2	4	8	2,5 - 15,5
4	11	63	52,3 - 83,0
5	8	70,5	25,0 - 86,0
6	11	80	64,3 - 87,0
7	2	74	73,0 - 75,0

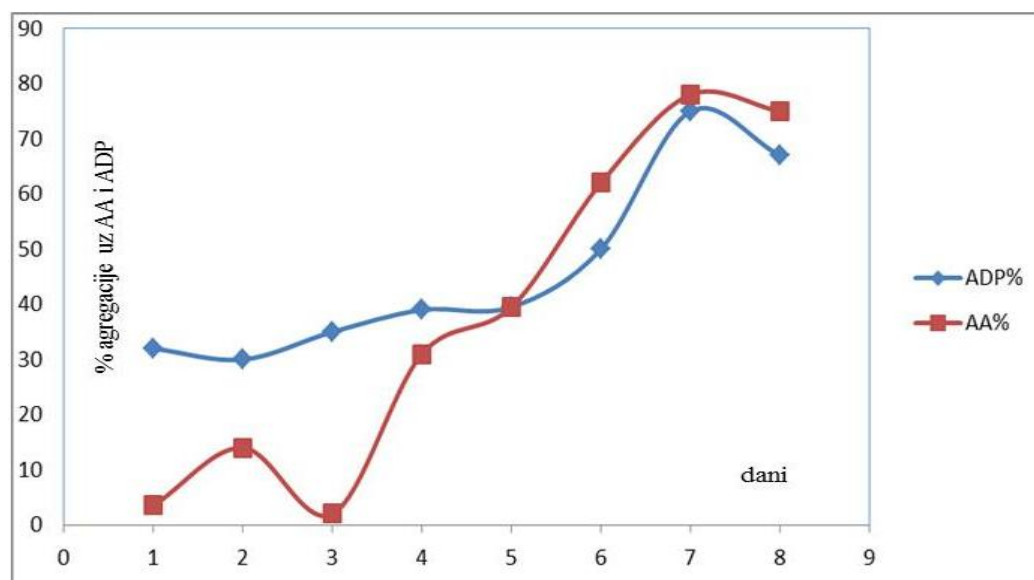


Slika 22. Grafički prikaz vrijednosti agregacije trombocita uz agonist arahidonsku kiselinu (AA) u ovisnosti o broju dana bez terapije acetilsalicilnom kiselinom (ASA)

U podskupini bolesnika liječenih samo acetilsalicilnom kiselinom, a kod kojih je navedeni lijek ukinut zbog potrebnog operativnog zahvata, vrijednosti agregacije trombocita postignule su vrijednosti iznad donje granice referentnog intervala (>60%) nakon 4. dana od ukidanja terapije (Slika 22).

Tablica 8. Vrijednosti agregacije trombocita uz agonist ADP u bolesnika kod kojih je antiagregacijska terapija lijekom iz skupine inhibitora ADP receptora ukinuta od 1 do 8 dana.

Broj dana bez terapije	Broj uzoraka (n)	ADP Median (%)	ADP IQR (%)	AA Median (%)	AA IQR (%)
1	4	32	28,5 - 41,5	3,5	2,5 - 9,0
2	3	30	24 - 47,3	14,0	6,5 - 15,5
3	1	35	---	2	---
4	2	39	28,0 - 50,0	31	20,0 - 42,0
5	4	40	27,0 - 55,0	39,5	26,5 - 62,5
6	3	50	23,0 - 59,8	62,0	20,8 - 64,3
7	1	75	---	78	---
8	3	67	53,5 - 67,0	75,0	60,0 - 75,0



Slika 23. Grafički prikaz vrijednosti agregacije trombocita uz agoniste ADP i arahidonsku kiselinu (AA) u ovisnosti o broju dana bez terapije kod bolesnika prethodno liječenih dvojnog ili kombiniranom terapijom s obe skupine lijekova (ASA i inhibitori ADP receptora)

U podskupini bolesnika liječenih kombiniranom terapijom inhibitorima ADP receptora (klopidogrel i tikagrelor) i inhibitorima COX-1 enzima kod kojih su oba lijeka privremeno ukinuta zbog potrebnog operativnog zahvata, vrijednosti agregacije trombocita su doseglye vrijednosti iznad donje granice referentnog intervala (>60%) nakon 7. dana uz ADP agonist i nakon 6. dana za AA agonist od ukidanja terapije (Slika 23).

Sve veća i šira primjena antiagregacijskih ili antitrombocitnih lijekova u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih incidenata, posljednjih je godina rezultirala intenzivnim nastojanjima uvođenja agregometrije trombocita u praćenju učinkovitosti liječenja navedenim lijekovima.

Osnovni cilj praćenja učinkovitosti liječenja antiagregacijske terapije primjenom agregometrije trombocita jest utvrditi da li lijek učinkovito djeluje na svoj molekularni cilj (ispitati terapijsku učinkovitost lijeka). Dodatno, agregometrija trombocita u praćenju ove terapije ima za cilj i predviđanje kliničkog ishoda bolesnika tj. pojavu sekundarnih ishemijskih događaja u liječenih bolesnika, a koji se definiraju kao glavni nepovoljni klinički ishodi te otkrivanje bolesnika koji pokazuju neučinkovit odgovor na antiagregacijske lijekove. Konačno, kao jedan od važnih potencijalnih ciljeva praćenja antiagregacijske terapije primjenom agregometrije navodi se i mogućnost podešavanja doze i vrste lijeka, odnosno individualni pristup liječenju temeljen na rezultatima laboratorijskog praćenja kako bi se postigao maksimalni terapijski učinak, a bez povećanog rizika od krvarenja (Harrison, 2007; Verstuyft, 2009).

U literaturi se posljednjih godina intenzivno raspravlja o prednostima i nedostacima primjene agregometrije trombocita u praćenju antiagregacijske terapije. Na temelju dosadašnjih rezultata istraživanja pokazano je da agregometrija trombocita pomaže u otkrivanju onih bolesnika koji imaju povećan rizik za razvoj neželjenih kliničkih događaja (Bonello, 2009; Bonello, 2010). U prilog ovome govore rezultati istraživanja koji su pokazali povezanost visoke ostatne reaktivnosti trombocita i pojave ishemijskih događaja u liječenih bolesnika (Smith, 2006; Geisler, 2006). S druge strane, na temelju dosadašnjih rezultata nije dokazano da se agregometrija trombocita može koristiti za podešavanje doze lijeka (Gachet, 2008). Drugim riječima, za sada nema kliničkih studija koje bi jasno utvrdile da promjena terapije (bilo doze ili vrste lijeka) prema rezultatu agregacije trombocita rezultira poboljšanim ishodom za bolesnika tj. da smanjuje pojavu sekundarnih ishemijskih događaja.

Razlozi koji za sada još uvijek ograničavaju ili dovode u pitanje kliničku značajnost agregometrije u praćenju antiagregacijske terapije su brojni i uključuju brojna metodološka ograničenja kao i patofiziološke čimbenike (Gachet, 2008, Sambu, 2011).

Kao prvo, da bi se uopće mogla procijeniti učinkovitost lijeka na temelju laboratorijske pretrage, potrebno je primijeniti testove koji su specifični za sam lijek, odnosno koji mjere specifično djelovanje lijeka na farmakološki cilj. Kada govorimo o agregometriji trombocita u praćenju antitrombocitne terapije, onda se to prvenstveno odnosi na mjerenje agregacije trombocita uz specifičan agonist za pojedinu skupinu lijekova. Za bolesnike liječene inhibitorima COX-1 enzima specifičan agonist je AA, a za bolesnike liječene inhibitorima ADP receptora specifičan agonist je ADP. U bolesnika liječenih s obje navedene skupine lijekova istodobno je potrebno odrediti agregabilnost trombocita uz oba navedena agonista, AA i ADP. Ovakav pristup primjeni agregometrije trombocita uz specifičan agonist potrebno je koristiti neovisno o metodi mjerenja (npr. klasična optička agregometrija ili agregometrija na *point of care* analizatorima) ili o uzorku u kojem se izvodi mjerenje (PRP ili puna krv). Važnost primjene specifičnih agonista proizlazi iz činjenice da samo test koji specifično mjeri farmakološki učinak određenog lijeka može razlučiti da li je pojačana reaktivnost trombocita rezultat nedovoljne farmakološke inhibicije. Smatra se da samo specifičan test za određenu skupinu lijekova ujedno omogućuje i otkrivanje onih bolesnika koji prejak reagiraju na lijek te imaju vrlo nisku ostatnu reaktivnost trombocita i time povećan rizik krvarenja (Siedel, 2011). Primjenom nespecifičnih agonista agregacije za određeni lijek, npr. epinefrina ili kolagena u bolesnika liječenih inhibitorima COX-1 enzima ili ADP receptora, može se procijeniti ostatna reaktivnost trombocita u odgovoru na fiziološke agoniste agregacije, ali ovi nespecifični testovi ne mogu pomoći u utvrđivanju neučinkovitog odgovora na lijek. Drugi važan razlog koji govori u prilog primjeni specifičnih agonista za lijek je taj što upravo specifičnost metode određuje pojavnost tzv. rezistencije ili tzv. neučinkovitog odgovora na liječenje. Sva dosadašnja istraživanja jasno su pokazala da pojavnost neučinkovitog odgovora na liječenje izravno ovisi o metodi koja se koristi. Primjenom metoda uz specifičan agonist udio bolesnika koji ne pokazuju odgovor na liječenje mjeren agregacijom trombocita je znatno manji nego kada se koriste testovi uz nespecifične agoniste (Tantry, 2005).

Metodološke teškoće koje otežavaju primjenu agregometrije trombocita u praćenju antiagregacijske terapije su nestandardiziranost zbog primjene različitih metoda, koncentracije agonista, nepostojanje definiranih terapijskih intervala i graničnih vrijednosti (engl. *cut-off values*) koje razlikuju učinkovit od neadekvatnog odgovora na terapiju, različit način

izražavanja rezultata i nepoznato optimalno vrijeme i dinamika izvođenja pretrage u odnosu na početak terapije.

Pojedine metode mjerenja agregacije trombocita nisu jednako primjenjive u praćenju antiagregacijske terapije. Smatra se da su među različitim metodama mjerenja agregacije trombocita u bolesnika na antiagregacijskoj terapiji, potencijalno prikladne samo metode koje mogu predvidjeti nepovoljne kliničke ishode, metode koje omogućuju primjenu specifičnog agonista agregacije za pojedinu skupinu lijekova te metode koje nisu tehnički zahtjevne u svojoj izvedbi kako bi se mogle primijeniti za veći broj uzoraka i u brojnim kliničkim specijalnostima (kardiologija, kirurgija, neurokirurgija, ginekologija, hematologija i dr.).

U provedenom ispitivanju agregabilnost trombocita mjerena je metodom optičke agregometrije na analitičkom sustavu nove generacije, Sysmex CS-2500. Ovaj analitički sustav omogućuje određivanje agregacije trombocita uz specifičan agonist za pojedinu skupinu lijekova tj. uz arahidonsku kiselinu u bolesnika liječenih ASA-om te uz agonist ADP u bolesnika liječenih inhibitorima ADP receptora. Nadalje, primjena agregometrije trombocita na ovom sustavu izvodi se, uz preporučene koncentracije pojedinih agonista (2 $\mu\text{mol/L}$ za ADP i 1 mmol/L za AA), što je važan korak u standardizaciji izvođenja pretraga agregacije trombocita. S druge strane, optička agregometrija trombocita na ovom analitičkom sustavu izvodi se u plazmi siromašnoj trombocitima, a sama metoda optičke agregometrije je tehnički dugotrajna i zahtjevna što otežava primjenu ove metode za svakodnevnu analizu većeg broja uzoraka bolesnika na antiagregacijskoj terapiji.

Provedeno ispitivanje imalo je za cilj ispitati vrijednosti agregacije trombocita uz primjenu specifičnog agonista za pojedinu skupinu antiagregacijskih lijekova. Ovim smo ispitivanjem pokazali da je agregabilnost trombocita značajno snižena u bolesnika liječenih antiagregacijskim lijekovima, što je potpuno očekivano i temelj je primjene ovih lijekova u prevenciji i liječenju arterijske tromboze. Agregabilnost trombocita uz agonist AA bila je izrazito snižena u gotovo svih bolesnika na terapiji ASA-om. Poznato je da se kontinuiranim uzimanjem malih doza acetilsalicilne kiseline (75 do 100 mg/dan) gotovo potpuno inhibira aktivacija trombocita u putu arahidonske kiseline, što objašnjava izrazito niske vrijednosti agregacije trombocita uz agonist AA u bolesnika liječenih ASA-om kao i u bolesnika liječenih dvojnou terapijom. S druge strane, agregabilnost trombocita uz specifičan agonist ADP u bolesnika liječenih inhibitorom ADP receptora, iako značajno snižena, ne postiže potpunu inhibiciju, na što upućuju u pravilu veće vrijednosti agregacije uz ADP agonist kod većine ispitanih bolesnika.

Važno zapažanje ovog ispitivanja jest to da su bolesnici liječeni novijim lijekom tikagrelorom pokazali jači stupanj inhibicije ADP receptora (niže vrijednosti agregacije uz ADP agonist) u odnosu na bolesnike liječene klopidogetrelom. Ovi rezultati govore u prilog saznanju da je lijek nove generacije tikagrelor snažniji inhibitor ADP receptora u odnosu na klopidogetrel (Bergovec, 2010; Knežević 2014).

Jedan od ciljeva u praćenju antiagregacijske terapije je i otkrivanje bolesnika koji neučinkovito odgovaraju na liječenje. Poznato je, međutim, da neučinkovit odgovor na antiagregacijsku terapiju može biti uzrokovan čitavim nizom mogućih uzroka i mehanizama (Michelson, 2006; Kulickowski, 2009). Nadalje, zbog multičimbenične prirode same ateroskleroze i posljedične tromboze, nemogućnost djelovanja antiagregacijskih lijekova vjerovatno je samo jedan u nizu uzroka koji rezultiraju ukupnim neadekvatnim odgovorom na liječenje. Međutim, za očekivati jest da mjerenje stupnja inhibicije agregabilnosti trombocita može pomoći u razlučivanju bolesnika koji pokazuju učinkovit odgovor na određenu skupinu antiagregacijskih lijekova. U bolesnika kod kojih izostaje inhibicija agregabilnosti trombocita uz specifičan agonist agregacije može se govoriti o tzv. laboratorijskoj procjeni neadekvatnog odgovora na antiagregacijsko liječenje. U provedenom ispitivanju, udio bolesnika kod kojih je izostala inhibicija agregabilnosti trombocita unatoč liječenju, pokazao se podudarnim literaturnim podacima za obje ispitivane skupine lijekova. Tako je u bolesnika liječenih ASA-om od ukupnog broja ispitanih bolesnika, njih 0,06 (3/48) pokazalo izostanak inhibicije uz agonist AA. Slično, kod 3/50 ili 0,06 bolesnika liječenih dvojnomo terapijom izostala je inhibicija agregabilnosti trombocita uz agonist ADP. Ovi su bolesnici imali vrijednosti agregacije trombocita uz specifičan agonist unutar referentnog intervala, za razliku od svih ostalih bolesnika kod kojih je agregabilnost bila izrazito snižena u odnosu na referentne vrijednosti. Nadalje, rezultati ovog ispitivanja potkrepljuju literaturne podatke da je mjerenjem agregacije trombocita uz specifičan agonist za pojedinu skupinu lijekova značajno manji u odnosu na metode u kojima nije moguće primijeniti određivanje agregacije uz specifičan agonist te je i udio bolesnika kod kojih izostaje inhibicija agregabilnosti trombocita značajno veći (Tantry, 2005).

U provedenom ispitivanju jednu od podskupina bolesnika činili su bolesnici kod kojih je liječenje antiagregacijskim lijekovima ukinuto zbog potrebnog operativnog zahvata. Rezultati ovog ispitivanja pokazali su da se oporavak funkcije trombocita mjeren uz specifičan agonist normalizira brže u bolesnika liječenih inhibitorom COX-1 enzima (ASA), u odnosu na bolesnike liječene inhibitorom ADP receptora. Tako se u bolesnika liječenih isključivo ASA-om funkcija trombocita oporavila na vrijednosti unutar referentnog intervala (>60%) već nakon 4.

dana od ukidanja lijeka, te 6. dana u podskupini bolesnika na kombiniranoj terapiji. Funkcija trombocita uz ADP receptor u podskupini bolesnika na kombiniranoj terapiji oporavila se jedan dan kasnije, tj. 7. dana od ukidanja terapije. Ovi rezultati su u skladu s dosadašnjim saznanjima koja objašnjavaju dinamiku oporavka funkcije trombocita nakon ukidanja terapije. Sporija normalizacija funkcije trombocita uz ADP receptor može se objasniti time što su lijekovi iz skupine inhibitora ADP receptora znatno snažniji inhibitori funkcije trombocita u odnosu na lijekove iz skupine inhibitora COX-1 enzima, odnosno ASA-u. Unatoč tome što se pri primjeni ASA-e postiže gotovo potpuna inhibicija funkcije trombocita uz agonist AA, a pri primjeni inhibitora ADP receptora uz ADP agonist postiže se samo djelomična inhibicija, čemu u prilog govore i značajno niže vrijednosti agregacije uz AA agonist u odnosu na ADP agonist u ispitanih bolesnika, nakon ukidanja lijeka funkcija trombocita uz AA agonist oporavlja se brže nego uz ADP agonist.

Nadalje, drugo važno zapažanje koje proizlazi iz rezultata ovog ispitivanja u bolesnika kod kojih je lijek ukinut, jest taj da je oporavak funkcije trombocita uz isti agonist i za istu skupinu lijekova, tj. AA za lijek ASA-u, vidljivo sporiji u bolesnika na kombiniranoj terapiji u odnosu na bolesnike liječene samo ASA-om. Ovaj rezultat se može objasniti činjenicom da se pri primjeni kombinirane terapije općenito postiže snažnija inhibicija funkcije trombocita u odnosu na primjenu samo jednog lijeka kao što je ASA. Upravo na tome se i temelji primjena dvojne ili kombinirane terapije koja se u pravilu primjenjuje u klinički težih bolesnika i bolesnika s većim brojem čimbenika rizika za trombozu, kako bi se kombiniranom terapijom postigla učinkovitija inhibicija funkcije trombocita. Naime, primjena dvojne terapije istodobno inhibira oba važna puta aktivacije trombocita, put arahidonske kiseline i aktivaciju putem ADP receptora, zbog čega je očekivano da će i normalizacija funkcije trombocita biti sporija kada se radi o dvojnoj u odnosu na terapiju samo jednim lijekom.

Rezultati ispitivanja u podskupinama bolesnika u kojih je ukinuta antiagregacijska terapija potpuno podupiru dosadašnja opažanja da je za djelotvoran oporavak funkcije trombocita općenito nakon ukidanja terapije potrebno najmanje vrijeme koje je potrebno da se broj trombocita u cirkulaciji obnovi za oko 50% što iznosi prosječno oko 5-6 dana, s obzirom da je ukupni životni vijek trombocita u cirkulaciji 10-ak dana, a dnevno u cirkulaciju dopijeva oko 10% od njihovog ukupnog broja.

Na kraju, može se zaključiti da, unatoč tome što je praćenje antiagregacijske terapije trenutno još uvijek primjenjivo više u istraživačke svrhe nego u svakodnevnom rutinskom radu zbog metodoloških ograničenja i nedovoljno standardiziranog pristupa ispitivanju, postoji potreba za uvođenjem agregometrije trombocita u praćenju liječenja ovih bolesnika. Kao bitan

preduvjet kliničke korisnosti agregometrije trombocita u praćenju bolesnika na antiagregacijskoj terapiji svakako je jasno definiranje graničnih vrijednosti koje bi omogućile pouzdano definiranje adekvatnog od neučinkovitog odgovora na antiagregacijsku terapiju te koje bi pomogle u donošenju kliničke preporuke ili odluke o promjeni doze ili vrste lijeka.

5. ZAKLJUČAK

1. Vrijednosti agregacije trombocita u bolesnika na antiagregacijskoj terapiji inhibitorima COX-1 enzima (ASA) i inhibitorima ADP receptora (klopidogrel i tikagrelor) kao i u bolesnika na dvojnoj (kombiniranoj) terapiji s obje navedene skupine lijekova, značajno su snižene u odnosu na referentne vrijednosti ($> 60\%$) uz oba specifična agonista, arahidonsku kiselinu i ADP.

2. U podskupini bolesnika liječenih acetilsalicilnom kiselinom, vrijednosti agregacije trombocita uz specifičan agonist arahidonsku kiselinu, nisu se značajno razlikovale između bolesnika liječenih andolom i aspirinom, kao niti između bolesnika liječenih samo ASA-om i onih na dvojnoj terapiji.

3. U bolesnika liječenih dvojnomo (kombiniranom) terapijom (ASA i inhibitor ADP receptora), agregabilnost trombocita uz specifičan agonist ADP bila je značajno niža u bolesnika liječenih tikagrelorom u odnosu na bolesnike liječene klopidogrelom.

4. Primjenom specifičnih agonista agregacije za pojedinu skupinu antiagregacijskih lijekova, udio bolesnika s vrijednostima agregacije unutar referentnog intervala tj. udio bolesnika u kojih je izostala inhibicija agregabilnosti bio je podjednak za bolesnike liječene ASA-om (0,06 ili $3/48$) i onih s dvojnomo terapijom ($3/50 = 0,06$ za inhibitor ADP receptora i $1/50 = 0,02$ za ASA-u).

5. U bolesnika kod kojih je antiagregacijska terapija ukinuta zbog operativnog zahvata, brži oporavak funkcije trombocita postiže se uz specifičan agonist arahidonsku kiselinu u bolesnika liječenih ASA-om, u odnosu na oporavak funkcije trombocita uz specifičan agonist ADP u bolesnika liječenih dvojnomo (kombiniranom) terapijom (ASA i inhibitor ADP receptora).

6. LITERATURA

Bahuleyan B. Hemostasis: a cell based model. *J Phys Pharm Adv* 2015;5:638-42.

Bergovec M, Vražić H. Antiagregacijska terapija. *Medicus* 2010;19:181-90.

Bhatt DL, Fox KAA, Hacke W i sur. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med* 2006;354:1706–17.

Bonello L, Camoin-Jau L, Armero S, Com O, Arques S, Burignat-Bonello C, Giacomoni MP, Bonello R, Collet F, Rossi P, Barragan P, Dignat-George F, Paganelli F. Tailored clopidogrel loading dose according to platelet reactivity monitoring to prevent acute and subacute stent thrombosis. *Am J Cardiol* 2009;103:5–10.

Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, Bhatt DL, Cattaneo M, Collet JP, Cuisset T, Gachet C, Montalescot G, Jennings LK, Kereiakes D, Sibbing D, Trenk D, Van Werkum JW, Paganelli F, Price MJ, Waksman R, Gurbel PA. Working Group on High On-Treatment Platelet Reactivity. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:919–33.

Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost* 2007;5(Suppl1):230-7.

Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CPM, Kenny D, Nugent D i sur. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost* 2013;11:1183–9.

Dobrovolsky 2002. The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. *Biochemistry (Mosc)* 2002;67:99-108.

Dovlatova N. Current status and future prospects for platelet function testing in the diagnosis of inherited bleeding disorders. *Br J Haematol*, 2015;170:150–61.

Fritsma GA. Platelet function testing: aggregometry and lumiaggregometry. Clin Lab Sci 2007;20:32–7.

Gachet C, Aleil B. Testing antiplatelet therapy. Eur Heart J Suppl 2008;10(Suppl A):A28-A34.

Gale AJ. Current understanding of hemostasis. Toxicol Pathol 2011;39:273-80.

Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. J Clin Invest 2005;115:3378-84.

Geisler T, Langer H, Wydymus M, Göhring K, Zürn C, Bigalke B, Stellos K, May AE, Gawaz M. Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation. Eur Heart J 2006;27:2420-5.

Gresele P, Momi S, Falcinelli E. Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors. Br J Clin Pharmacol 2011;72:634-46.

Harrison P. Platelet function testing. Blood Rev 2005;19:111-23.

Harrison P, Frelinger AL, Furman MI, Michelson AD. Measuring antiplatelet drug effects in the laboratory. Thromb Res 2007;120:323-36.

Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, Machin S and British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. Br J Haematol 2011;155:30-44.

Hayward CP. Diagnostic approach to platelet function disorders. Transfus Apher Sci 2008;38:65–76.

Hayward CP, Pai M, Liu Y, Moffat A, Seecharan J, Webert KE i sur. Diagnostic utility of light transmission platelet aggregometry: results from a prospective study of individuals referred for bleeding disorder assessments. J Thromb Haemost 2009;7:676–84.

Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Hemost* 2001;85:958-65.

Knežević A. Inhibitori ADP-om ovisne agregacije trombocita. *Cardiol Croat* 2014;9:48-52.

Korte W, Cattaneo M, Chassot PG, Eichinger S, von Heymann C, Hofmann N, Rickli H, Spannagl M, Ziegler B, Verheugt F, Huber K. Peri-operative management of antiplatelet therapy in patients with coronary artery disease: joint position paper by members of the working group on Perioperative Haemostasis of the Society on Thrombosis and Haemostasis Research (GTH), the working group on Perioperative Coagulation of the Austrian Society for Anesthesiology, Resuscitation and Intensive Care (ÖGARI) and the Working Group Thrombosis of the European Society for Cardiology (ESC). *Thromb Haemost.* 2011;105:743-9.

Kuliczkowski W, Witkowski A, Polonski L, Watala C, Filipiak K i sur. Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2009;30:426–35.

Margetić S. Agregacija trombocita. Kako, kada i zašto mjeriti. U: Getaldić i sur. Trombociti - interdisciplinarni pristup, Zagreb, Medicinska naklada, 2017; str: 49-68.

Margetic S. Inflammation and haemostasis. *Biochem Med* 2012;22:46-62.

Margetić S, Čaržavec D. Bolesti hemostaze. U: Topić E. i sur., Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi, 2. izdanje, Zagreb, Medicinska naklada, 2018; str: 349-87.

McKenzie SB, Williams JL. Primary hemostasis. U: Clinical Laboratory Hematology, 2. izdanje, Edinburgh, Pearson, 2014; str: 713-42.

Michelson AD. How platelets work: platelet function and dysfunction. *J Thromb Thrombol* 2003;16:7–12.

Michelson AD, Frelinger AL, Furman MI. Resistance to antiplatelet drugs. *Eur Heart J Suppl.* 2006;Suppl G:G53–G58.

Nguyen T.A., Diodati J. G., Pharand C. Resistance to clopidogrel: a review of the evidence. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1157-64.

Lenk E, Spannagl M. Platelet function testing-guided antiplatelet therapy. *J Internat Feder Clin Chem Lab Med* 2014;24:90-6.

Orme R, Judge HM, Storey RF. Monitoring antiplatelet therapy. *Semin Thromb Hemost* 2017;43:311-9.

Paniccia R, Priora R, Alessandrello Liotta A, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Man* 2015;11:133-48.

Sambu N, Curzen N. Monitoring the effectiveness of antiplatelet therapy: opportunities and limitations. *Br J Clin Pharmacol* 2011;72:683-96.

Samos M, Fedor M. Monitoring of antiplatelet therapy in clinical practice: is it necessary or not? *J hematol Thromb Dis* 2014;2:1.

Seidel H i sur. Monitoring of antiplatelet therapy. *Hamostaseologie* 2011;31:41-51.

Smith SC, Jr., Feldman TE, Hirshfeld JW Jr et al. ACC/AHA/SCAI 2005 Guideline Update for Percutaneous Coronary Intervention – summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). *Circulation* 2006;113:156–75.

Stangl PA, Lewis S. Review of currently available GP IIb/IIIa inhibitors and their role in peripheral vascular interventions. *Semin Intervent Radiol* 2010;27:412–21.

Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA. Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachadonic acid stimulation. J Am Coll Cardiol 2005;46:1705–9.

Verstuyft C, Simon T, Kim RB. Personalized medicine and antiplatelet therapy: ready for prime time? Eur Heart J 2009;30:1943:63.

Vrsalović M. Sezonske promjene pojedinih upalnih i hemostatskih pokazatelja i njihova povezanost s klimatskim faktorima u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom, doktorska disertacija, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2009.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

Antiagregacijski (antitrombocitni) lijekovi posljednjih se godina sve češće koriste u prevenciji i liječenju arterijske tromboze koja se klinički očituje akutnim ishemijskim događajima. Kontinuirani porast primjene ovih lijekova nametnuo je potrebu za uvođenjem agregometrije trombocita u procjeni učinkovitosti liječenja. Iako ove pretrage još uvijek nisu sastavni dio rutinske laboratorijske dijagnostike zbog nedovoljne standardizacije, očita je potreba za njezinim uvođenjem u praćenju liječenja ovih bolesnika. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj antiagregacijskih lijekova na agregabilnost trombocita uz primjenu specifičnih agonista za pojedinu skupinu lijekova (acetilsalicilna kiselina (ASA) i/ili inhibitori ADP receptora) metodom optičke agregometrije na analitičkom sustavu Sysmex CS-2500. Agregabilnost trombocita bila je značajno snižena za obe skupine antiagregacijskih lijekova u odnosu na referentne vrijednosti. U bolesnika kod kojih je antiagregacijska terapija ukinuta zbog operativnog zahvata, oporavak funkcije trombocita postiže se brže u bolesnika liječenih ASA-om, u odnosu na bolesnike liječene inhibitorom ADP receptora ili kombiniranom terapijom.

7.2. Summary

In recent years inhibitors of platelet aggregation (antiplatelet drugs) are increasingly used in the prevention and treatment of arterial thrombosis that is clinically manifested by acute ischemic events. Continued increase in the use of these drugs has imposed the need for introducing platelet aggregometry to assess the efficiency of treatment. Although these assays still are not a part of routine laboratory diagnostics due to insufficient standardization, the need for its introduction in treatment of these patients is apparent. The aim of this study was to investigate the effect of antiplatelet drugs on platelet aggregation using specific agonists for particular drug group (acetylsalicylic acid (ASA) and /or ADP receptor inhibitors) by light transmission aggregometry method on the Sysmex CS 2500 analytical system. Platelet aggregation was significantly reduced for both groups of antiplatelet drugs compared to the reference values. In patients with antiplatelet therapy abolished due to surgery, recovery of platelet function was achieved faster in patients treated with ASA compared to patients treated with inhibitors of ADP receptors or those with combined therapy.

8. PRILOZI

8.1. POPIS KRATICA

GP Ib/IX/V - glikoproteinski kompleks Ib/IX/V

vWF - von Willebrandov čimbenik (*engl. von Willebrand factor*)

GPIb α - glikoprotein Ib α

PAR - proteazom aktiviran receptor (*engl. protease activated receptor*)

ADP - adenzin-difosfat

TXA₂ - tromboksan A₂

GP IIb/IIIa - glikoproteinski kompleks IIb/IIIa

TF - tkivni faktor (*engl. tissue factor*)

tPA - tkivni aktivator plazminogena

uPA - urokinazni aktivator plazminogena

α_2 -AT - α_2 -antiplazmin

PAI-1 - inhibitor aktivatora plazminogena-1

TAFI - trombinom aktivirani inhibitor fibrinolize (*engl. thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*)

MPV - srednji volumen trombocita (*engl. mean platelet volume*)

AA - arahidonska kiselina (*engl. arachidonic acid*)

PRP - plazma bogata trombocitima (*engl. platelet rich plasma*)

ISTH - Međunarodno društvo za hemostazu i trombozu (*engl. International Society on Thrombosis and Haemostasis*)

POCT - pretraga uz bolesnika (*engl. point of care*)

ATP - adenzin-trifosfat

AIM - akutni infarkt miokarda

MU - moždani udar

ASA - acetilsalicilna kiselina (*engl. acetylsalicylic acid*)

COX-1 - ciklooksigenaza-1

PdE - fosfodiesteraza

cAMP - ciklički adenzin monofosfat

AMP - adenzin monofosfat

MACE - glavni nepovoljni klinički ishodi (engl. *major adverse clinical events*)

PPP - plazma siromašna trombocitima (engl. *platelet poor plasma*)

OD - optička gustoća (engl. *optical density*)

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

PRAĆENJE ANTIAGREGACIJSKE TERAPIJE METODOM OPTIČKE AGREGOMETRIJE NA ANALITIČKOM SUSTAVU SYSMEX CS-2500

Ivona Kuktić

SAŽETAK

Antiagregacijski (antitrombocitni) lijekovi posljednjih se godina sve češće koriste u prevenciji i liječenju arterijske tromboze koja se klinički očituje akutnim ishemijskim događajima. Kontinuirani porast primjene ovih lijekova nametnuo je potrebu za uvođenjem agregometrije trombocita u procjeni učinkovitosti liječenja. Iako ove pretrage još uvijek nisu sastavni dio rutinske laboratorijske dijagnostike zbog nedovoljne standardizacije, očita je potreba za njezinim uvođenjem u praćenju liječenja ovih bolesnika. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj antiagregacijskih lijekova na agregabilnost trombocita uz primjenu specifičnih agonista za pojedinu skupinu lijekova (acetilsalicilna kiselina (ASA) i/ili inhibitori ADP receptora) metodom optičke agregometrije na analitičkom sustavu Sysmex CS-2500. Agregabilnost trombocita bila je značajno snižena za obe skupine antiagregacijskih lijekova u odnosu na referentne vrijednosti. U bolesnika kod kojih je antiagregacijska terapija ukinuta zbog operativnog zahvata, oporavak funkcije trombocita postiže se brže u bolesnika liječenih ASA-om, u odnosu na bolesnike liječene inhibitorom ADP receptora ili kombiniranom terapijom.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 59 stranica, 23 grafičkih prikaza, 8 tablica i 42 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: primarna hemostaza, trombociti, optička agregometrija, arterijska tromboza, antiagregacijska terapija, acetilsalicilna kiselina, inhibitori ADP receptora

Mentori: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Sandra Margetić, *znanstveni suradnik, KBC Sestre milosrdnice, Zagreb*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Sandra Šupraha-Goreta**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Nada Vrkić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Sandra Margetić, *znanstveni suradnik, KBC Sestre milosrdnice, Zagreb*

Rad prihvaćen: rujan 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of Biochemistry and Molecular Biology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

MONITORING OF ANTIPLATELET THERAPY BY OPTICAL AGGREGOMETRY ON SYSMEX CS-2500 ANALYTICAL SYSTEM

IVONA KUKTIĆ

SUMMARY

In recent years inhibitors of platelet aggregation (antiplatelet drugs) are increasingly used in the prevention and treatment of arterial thrombosis that is clinically manifested by acute ischemic events. Continued increase in the use of these drugs has imposed the need for introducing platelet aggregometry to assess the efficiency of treatment. Although these assays still are not a part of routine laboratory diagnostics due to insufficient standardization, the need for its introduction in treatment of these patients is apparent. The aim of this study was to investigate the effect of antiplatelet drugs on platelet aggregation using specific agonists for particular drug group (acetylsalicylic acid (ASA) and /or ADP receptor inhibitors) by light transmission aggregometry method on the Sysmex CS 2500 analytical system. Platelet aggregation was significantly reduced for both groups of antiplatelet drugs compared to the reference values. In patients with antiplatelet therapy abolished due to surgery, recovery of platelet function was achieved faster in patients treated with ASA compared to patients treated with inhibitors of ADP receptors or those with combined therapy.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 59 pages, 23 figures, 8 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: platelet, platelet aggregation inhibitors, the optical light transmission aggregometry, primary hemostasis, arterial thrombosis, acetylsalicylic acid, ADP receptor inhibitors

Mentors: **Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry,
Sandra Margetić, Ph.D., Research associate, Clinical Hospital Center Sestre milosrdnice, Zagreb

Reviewers: **Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Nada Vrkić, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sandra Margetić, Ph.D. Research associate, Clinical Hospital Center Sestre milosrdnice, Zagreb

The thesis was accepted: September 2018

